

**METHODIK UND ANWENDUNG
DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN
GASTRINBESTIMMUNG**

Gernot Klewar

—

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0005

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

METHODIK UND ANWENDUNG
DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN
GASTRINBESTIMMUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilian-Universität zu München



vorgelegt von
Gernot Klewar
aus
Obergünzburg

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. M.M. Forell

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.10.1978



INHALTSVERZEICHNIS

1.0.0.0.	EINLEITUNG	1
1.1.0.0.	Aufgabenstellung der Arbeit	6
2.0.0.0.	METHODE DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG VON GASTRIN	8
2.1.0.0.	Material und Methoden zur Markierung mit ^{125}Jod	8
2.1.1.0.	Reagenzien	8
2.1.2.0.	Puffer und Lösungen	9
2.1.3.0.	Vorbereitung der Säulen für Chromato- graphie und Rechromatographie	10
2.1.4.0.	Durchführung der Markierung	11
2.1.5.0.	Gelchromatographische Trennung	12
2.1.6.0.	Modifikationen der Gastrinmarkierung	16
2.1.6.1.	Unterschiedliche Reaktionszeiten	
2.1.6.2.	Verschiedene Chloramin-T-Konzentrationen	
2.1.6.3.	Unterschiedliches Verhältnis ^{125}Jod zu Gastrin	
2.1.6.4.	Markierung von synthetischem (15-Leucin)- Humangastrin I (SHG I)(WÜNSCH)	
2.1.6.5.	"Trace Iodination"	
2.1.6.6.	Verschiedene Natriumbisulfit-Konzentrationen	
2.1.6.7.	Endgültige Modifikation der Markierung	
2.1.6.8.	Berechnung der spezifischen Aktivität	
2.1.7.0.	Haltbarkeit des markierten Humangastrin I	24
2.1.8.0.	Reproduzierbarkeit der Standardkurve mit ^{125}Jod -Gastrin (ICI) einer Markierung	26
2.2.0.0.	Gastrin-Antiserum	28
2.2.1.0.	Einführung	28
2.2.2.0.	Ermittlung der Endverdünnung	28

2.2.2.1.	Einführung	
2.2.2.2.	Reagenzien	
2.2.2.3.	Methodik	
2.2.2.4.	Ergebnis	30
2.2.3.0.	Vergleich verschiedener Antiserum-Chargen	
2.3.0.0.	Standard	34
2.3.1.0.	Einführung	34
2.3.2.0.	Reagenzien	34
2.3.3.0.	Herstellen der Standardlösungen	34
2.3.3.1.	Human little Gastrin (GREGORY)	
2.3.3.2.	Synthetisches Humangastrin I (ICI)	
2.3.3.3.	Synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH)	
2.3.3.4.	Serum-Verdünnungskurve	
2.3.4.0.	Durchführung der Vergleichsuntersuchung	36
2.3.5.0.	Ergebnis	36
2.4.0.0.	Zweiter Antikörper	38
2.4.1.0.	Einführung	38
2.4.2.0.	Reagenzien, Puffer und Lösungen	39
2.4.3.0.	Methode	39
2.4.4.0.	Ergebnis	40
2.4.5.0.	Vergleich von zwei Chargen des zweiten Antikörpers	41
2.4.6.0.	Kinetik der Fällungsreaktion	44
2.5.0.0.	Inkubationsbedingungen	46
2.5.1.0.	Kinetik von Gastrin-Antiserum 2604-(8)	46
2.5.1.1.	Reagenzien	
2.5.1.2.	Methode	
2.5.1.3.	Ergebnis	
2.5.2.0.	pH-Wert	48
2.5.2.1.	Reagenzien	

2.5.2.2.	Methode	
2.5.2.3.	Ergebnis	
2.5.3.0.	Albumingehalt	50
2.5.3.1.	Reagenzien	
2.5.3.2.	Methode	
2.5.3.3.	Ergebnis	
2.5.4.0.	Vorinkubation	53
2.5.4.1.	Reagenzien	
2.5.4.2.	Methode	
2.5.4.3.	Ergebnis	
2.6.0.0.	Durchführung der radioimmunologischen Gastrinbestimmung	56
2.6.1.0.	Reagenzien	56
2.6.2.0.	Puffer und Lösungen	56
2.6.3.0.	Methode	57
2.6.3.1.	Vorbereitungen für einen Ansatz	
2.6.3.2.	Volumina	
2.6.3.3.	Pipettieren	
2.6.3.4.	Zugabe des 125 Jod-Gastrin	
2.6.3.5.	Zugabe des zweiten Antikörpers	
2.6.3.6.	Trennen des Antikörper-gebundenen vom freien Gastrin	
2.6.3.7.	Messen der Radioaktivität	
2.6.3.8.	Auswertung	
2.7.0.0.	Angaben zur Präzision	62
2.7.1.0.	Intra-Assay-Variation	62
2.7.2.0.	Inter-Assay-Variation	63
2.7.3.0.	Untere Nachweisgrenze	65
2.7.4.0.	Regressionskoeffizient	65

3.0.0.0.	BEISPIELE FÜR DIE PRAKTISCHE ANWENDUNG DER BESTIMMUNGSMETHODE IN EXPERIMENT UND KLINIK	66
3.1.0.0.	Normalkollektiv	66
3.1.1.0.	Einführung	66
3.1.2.0.	Material und Methodik	66
3.1.3.0.	Ergebnis	67
3.2.0.0.	Untersuchungen mit Ratten-Serumgastrin	70
3.2.1.0.	Rattenserum-Verdünnungskurve	70
3.2.1.1.	Material und Methodik	
3.2.1.2.	Ergebnis	
3.2.2.0.	Ratten-Normalkollektiv	73
3.2.2.1.	Material und Methodik	
3.2.2.2.	Ergebnis	
3.3.0.0.	Verhalten von Serumgastrin nach intra- duodenaler Gabe von Galle, Calciumchlorid und Natriumchlorid	75
3.3.1.0.	Intraduodenale Gabe von Galle	75
3.3.1.1.	Einführung	
3.3.1.2.	Probanden und Methodik	
3.3.1.3.	Ergebnis	
3.3.2.0.	Intraduodenale Gabe von Calciumchlorid	78
3.3.2.1.	Probanden und Methodik	
3.3.2.2.	Ergebnis	
3.3.3.0.	Intraduodenale Gabe von Natriumchlorid	81
3.3.3.1.	Einführung	
3.3.3.2.	Ergebnis	
3.3.4.0.	Verhalten von Serumgastrin während Secretin-Infusion und gleichzeitiger intraduodenaler Gabe von Calcium- bzw. Natriumchlorid	83
3.3.4.1.	Einführung	

3.3.4.2.	Material und Methodik	
3.3.4.3.	Ergebnis	
3.3.5.0.	Verhalten von Serumgastrin nach i.v.-Gabe von Secretin/Cholecystokinin und nach gleichzeitiger intraduodenaler Gabe von Galle	89
3.3.5.1.	Einführung	
3.3.5.2.	Probanden und Methodik	
3.3.5.3.	Ergebnis	
3.4.0.0.	Verhalten von Serumgastrin bei Insulin- Hypoglykämie 1 Jahr nach selektiv- proximaler Vagotomie	94
3.4.1.0.	Einführung	94
3.4.2.0.	Patienten und Methodik	94
3.4.3.0.	Ergebnis	95
3.5.0.0.	Verhalten von Serumgastrin nach oraler Gabe von L-Dopa	98
3.5.1.0.	Einführung	98
2.5.2.0.	Probanden und Methodik	98
3.5.3.0.	Ergebnis	99
3.6.0.0.	Einfluß von Somatostatin auf die Glukose- induzierte Gastrinfreisetzung	100
3.6.1.0.	Einführung	100
3.6.2.0.	Patienten und Methodik	100
3.6.3.0.	Ergebnis	101
4.0.0.0.	DISKUSSION	105
5.0.0.0.	ZUSAMMENFASSUNG	115

1.0.0.0. EINLEITUNG

Seit 1905 ist eine Substanz bekannt, die von ihrem Erstbeschreiber EDKINS "Gastrin" genannt wurde (9). Es war das zweite nach Secretin beschriebene Hormon. In den Jahren 1962 bis 1966 waren jedoch erst entscheidende Fortschritte möglich, nachdem der Arbeitsgruppe um GREGORY und TRACY aus Liverpool die Reindarstellung von Gastrin aus Antrumextrakt, die Strukturaufklärung und Synthese von menschlichen Gastrin gelungen war. Erst durch diese biochemische Pionierleistung war klar, daß es sich um ein Polypeptid aus 17 Aminosäuren handelt, das in einer sulfatierten und einer nichtsulfatierten Form vorkommt. Das erste, Gastrin I genannt, hat ein Molekulargewicht von 2096, während das am Tyrosylrest in Position 12 mit Sulfat veresterte Gastrin II ein Molekulargewicht von 2176 hat (22).

Human Gastrin I (1-17) [2.200]	**Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH ₂
Human Gastrin I (2-17) [2.054]	Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH ₂
Porcine Gastrin I [2.114]	**Glu-Gly-Pro-Trp-Met-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH ₂ SO ₃ H
Porcine Gastrin II [2.193]	**Glu-Gly-Pro-Trp-Met-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH ₂
Canine Gastrin I [2.056]	**Glu-Gly-Pro-Trp-Met-Glu-Glu-Ala-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH ₂
Tetragastrin [614]	Trp-Met-Asp-PheNH ₂
Pentagastrin [770]	Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-PheNH ₂
Porcine Cholecystokinin [3.883]	Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-Asn-Leu-Gln-Ser-Leu-Asp- SO ₃ H Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH ₂

Abb. 1: Aminosäuresequenzen mit Angaben des Molekulargewichts (in eckiger Klammer) vom Gastrin des Menschen und verschiedener Tierspezies, vom Tetra- und Pentagastrin sowie Cholecystokinin (nach Rehfeld et al., 58).

In der Folgezeit wurden nicht nur die Strukturen von verschiedenen Gastrinarten anderer Spezies aufgeklärt (Abb. 1), sondern auch weitere Formen von Gastrin im menschlichen Serum (15, 56) entdeckt (Tab. 1).

Tab. 1: Gastrin-Komponenten im Serum (modifiziert nach FEURLE, 13). Angegeben sind Anzahl der Aminosäuren, Molekulargewicht (MG) und biologische Halbwertszeit (HWZ) für jedes der bekannten Gastrinmoleküle.

	Aminosäuren	MG	HWZ(min)
1. Big-big	?	?	?
2. Component I	45 ?	?	?
3. Big I	34	3900	16
4. Big II	34	3900	16
5. Little I	17	2096	3
6. Little II	17	2176	3,9
7. Mini I	14	1700	3,1
8. Mini II	14	1700	?

Die Aminosäuresequenz von "Big Gastrin", "Little Gastrin" und "Mini Gastrin" ist bekannt. Die Sequenz der 14 vom C-terminalen Ende gezählten Aminosäuren ist bei diesen Gastrin-Komponenten identisch. Kleinster gemeinsamer Bestandteil ist das C-terminale Tetrapeptid, welches die funktionelle Gruppe darstellt, d.h. die volle Wirksamkeit aller Gastrinmoleküle besitzt. Ein identisches C-terminales Tetrapeptid ist im Cholecystokinin vorhanden (s. Abb. 1). Die Strukturen von "Big-big Gastrin" und "Component I" sind noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise ist "Big-big" ein Artefakt, das bei der Gelchromatographie entsteht (59).

Gastrin wird vor allem von G-Zellen der Antrumschleimhaut gebildet, die durch Immunofluoreszenz und elektronenmikroskopische Untersuchungen als pyramidenförmige Gebilde im mittleren Drittel der Antrumdrüseneschläuche nachgewiesen werden konnten (54). Über Mikrovilli stehen sie mit dem Drüsenlumen in direktem Kontakt und können unmittelbar auf Veränderungen des pH-Wertes des Magensaftes und der Zusammensetzung der in den Magen gelangenden Nahrung reagieren. Darüberhinaus konnten die G-Zellen auch im Duodenum, Jejunum und vereinzelt in den Pankreasinseln nachgewiesen werden; letztere stellen die extragastrischen Bildungsorte für Gastrin dar (4, 5, 23, 37, 54).

Die Freisetzung von Gastrin aus den G-Zellen erfolgt durch lokale Einwirkung verschiedener Nahrungssubstanzen, vor allem Eiweiße, weniger Fett und Kohlenhydrate, und durch direkten und indirekten Vagusreiz (23, 24). Die antrale Dehnung hat für die Gastrinfreisetzung des Menschen eine nur untergeordnete Bedeutung (48). Unter experimentellen Bedingungen läßt sich durch parenterale Zufuhr von Calcium, Acetylcholin, Katecholaminen oder Insulin eine Steigerung der Gastrinausschüttung erzielen (2, 8, 17, 53, 63, 64). Ebenfalls eine Stimulation der Gastrinfreisetzung bewirken oral zugeführte Aminosäuren und Äthanol, in geringerem Maße auch die Gabe von Antacida und oraler Glukose (46, 57).

Die Gastrinausschüttung reguliert sich selbst durch ihre pH-Abhängigkeit. Sinkt durch HCl - Produktion das pH im Antrum, so wird weniger Gastrin freigesetzt. Unterhalb von pH 1,5 sistiert die Gastrinausschüttung (24, 48). Während einer 24-stündigen Fastenperiode ist eine geringe Schwankung des Gastrinspiegels im Serum mit einem Minimum zwischen 3 und 7 Uhr morgens und einem Gipfel am Nachmittag festzustellen. Es gibt also auch einen nahrungsunabhängigen

circadianen Rhythmus der Gastrinausschüttung (14, 48).

Der Gastrinstoffwechsel, insbesondere der Abbau, ist noch wenig erforscht. Über den Katabolismus in der Leber, Dünndarm und Niere liegen unterschiedliche Ergebnisse vor (36). Pentagastrin wird in der Leber abgebaut, während die endogenen Gastrinformen im Dünndarm und vor allem in der Niere inaktiviert werden. Die biologische Halbwertszeit ist sehr kurz (s.Tab.1).

Gastrin wirkt auf die Motilität und auf die Sekretionsaktivität des Gastrointestinaltraktes ein (11). Eine besondere Bedeutung hat die Stimulation der Belegzellen in der Corpusschleimhaut, welche die HCl-Produktion ausführen. Die Stimulation der Magensekretion ist durch Gastrin 500 x stärker (auf molarer Basis) als durch Histamin (24, 48). Ein zweiter Effekt ist die Förderung der peristaltischen Aktivität des Magens und die Erhöhung des gastroösophagealen Sphinktertonus. Gleichzeitig wird die Kontraktion des Sphinkter Oddi gehemmt (24).- In höheren, zum Teil pharmakologischen Dosen führt Gastrin zu Wachstum von Corpus- und Antrumschleimhaut, fördert die Insulinfreisetzung und stimuliert die glatte Muskulatur von Darm, Gallenblase und Uterus (36).

Ein Krankheitsbild, bei dessen Entstehung Gastrin ursächlich beteiligt ist, ist das Zollinger-Ellison-Syndrom (34). Es handelt sich dabei meist um Pankreastumoren, sog. Gastrinome, die autonom Gastrin produzieren. Durch extrem hohe Serumgastrinkonzentrationen (bis weit über 1000 pg/ml) kommt es zu dauernder Stimulation der Magensäuresekretion, morphologisch zu glandulärer Hyperplasie der Belegzellen. Daraus resultieren therapieresistente Ulcera des Duodeni.

und Jejunums, Maldigestion und Steatorrhoe infolge säurebedingter Inaktivierung der Pankreaslipase sowie Diarrhoe aufgrund der Motilitätssteigerung des Dünndarms und der geminderten Wasser- und Elektrolytresorption (17, 34).- Die Diagnose läßt sich durch Bestimmung des Serumgastrinspiegels sowie durch zusätzliche Tests mit Secretin, Calcium und Glukagon erhärten. Secretin und Glukagon bewirken (im Gegensatz zum Verhalten bei Normalpersonen oder Patienten mit chronisch-rezidivierenden Ulcera duodeni ohne autonome Gastrinproduktion) einen paradoxen Anstieg des Serumgastrins; ebenso führt intravenöse Calcium-Injektion oder - Infusion zu einem deutlichen Anstieg des Gastrinspiegels auf das mehrfache des Ausgangswertes (17).

Weitere Krankheiten, die mit einer Erhöhung des basalen Serumgastrins einhergehen, sind die chronisch-atrophische Gastritis mit oder ohne perniziöse Anämie, ein großer Anteil der Fälle von Ulcus ventriculi und Magenkarzinom, Zustände nach Vagotomie, Niereninsuffizienz, das sog. short-bowel-Syndrom und Einzelfälle von Hyperparathyreoidismus (17, 36, 41, 48, 62). Aufgrund dieser Angaben über die differentialdiagnostischen Möglichkeiten einer basalen Hypergastrinämie sowie zusätzlicher wissenschaftlicher Fragestellungen ergab sich die klinische und experimentelle Notwendigkeit, einen Radioimmunoassay für Gastrin zu erarbeiten (44).

1.1.0.0. Aufgabenstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll eine radioimmunologische Bestimmungsmethode für Serumgastrin erstellt und ihre klinische und experimentelle Anwendbarkeit untersucht werden.

Im einzelnen werden folgende Probleme bearbeitet:

1. Standardisierung und Optimierung der konventionellen Chloramin-T-Methode für die Markierung von Gastrin mit ^{125}Jod ; Untersuchung der mittleren spezifischen Aktivität und der Haltbarkeit des radioaktiv markierten Gastrins.
2. Vergleich des radioimmunologischen Verhaltens von verschiedenen Gastrin-Standard-Präparationen mit menschlichem Serumgastrin.
3. Optimierung der Versuchsbedingungen für die Durchführung der radioimmunologischen Gastrinbestimmung durch Variation von Inkubationszeiten, Konzentrationen der verwendeten Reagenzien, pH-Wert und Albumingehalt des Inkubationsgemisches.
4. Ermittlung der Präzisionsparameter für die radioimmunologische Bestimmungsmethode und Erstellung des Normalbereichs von Gastrin im menschlichen Serum.
5. Untersuchungen zur Verwendbarkeit des spezifischen Gastrin-Antiserums bei der Messung von Serumgastrin der Ratte.
6. Untersuchung des Serumgastrins nach intraduodenaler Gabe von Galle beim Menschen unter der Fragestellung einer

möglichen Vermittlerrolle des Gastrins bei der Galle-stimulierten exokrinen Pankreassekretion.

7. Untersuchung des Serumgastrin-Verhaltens während Insulin-Hypoglykämie bei Patienten 1 Jahr nach selektiv-proximaler Vagotomie.

8. Untersuchung des Serumgastrins nach oraler Gabe von Dopa zur Frage einer lokalen Stimulierbarkeit von Gastrin durch Katecholaminvorstufen.

9. Untersuchung des Serumgastrins im Rahmen eines oralen Glukosetoleranz-Testes mit und ohne gleichzeitige Verabreichung von Somatostatin.

2.0.0.0. METHODE DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG VON GASTRIN

2.1.0.0. Material und Methoden zur Markierung mit ^{125}Jod

Die Markierung von Gastrin erfolgt unter Verwendung von ^{125}Jod -Natriumjodid nach einer eigenen Modifikation (44) der konventionellen Chloramin-T-Methode von HUNTER und GREENWOOD (32, 33). Dabei orientierten wir uns an Mitteilungen über verschiedene Modifikationen dieser Markierungstechnik mit Chloramin T (11, 19, 21, 23, 28, 35, 60, 61, 72). Bei dieser Methode wird das Jodid-Ion durch das Oxidationsmittel Chloramin T in elementares Jod umgewandelt, welches sich mit dem Tyrosinrest des Peptidhormones verbindet. Bei zu hoher Konzentration von Chloramin T oder zu langer Reaktionszeit mit dem Peptid tritt ein störender Oxidationseffekt an den Sulfhydrylgruppen auf, der zur Zerstörung der Hormonstruktur führt ("damaged hormone").

Der Oxidationsvorgang wird mit Natriumbisulfit gestoppt, das als Reduktionsmittel den restlichen Anteil elementaren Jods wieder in Jodid umwandelt.

Die Reinigung des radioaktiv markierten Gastrins erfolgt mittels gelchromatographischer Trennung über eine Sephadex-G-10-Säule. Eine Nachreinigung mittels Rechromatographie über eine Sephadex-G-25/50-Säule schließt sich an.

2.1.1.0. Reagenzien

- 1) ^{125}Jod -Natriumjodid zur Eiweißmarkierung ohne Reduktionsmittel, spezifische Aktivität 8 - 15 Ci ^{125}Jod pro mg Jodid, Gesamtaktivität 2 mCi $^{125}\text{Jod} \pm 20\%$,

Halbwertszeit 60 Tage

(Farbwerke Hoechst AG, Best.-Nr. J 5006);

- 2) Reines synthetisches Humangastrin I (SHG I)
(Imp. Chem. Indust., England, Batch 630/20);
- 3) Natriumbisulfit, trocken, MG = 190,1
(Reagenzien Merck, Nr. 6528);
- 4) Kaliumjodid, neutral, MG = 166,01
(Reagenzien Merck, Nr. 5043);
- 5) Chloramin T, MG = 281,69
(Reagenzien Merck, Nr. 2426);
- 6) Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, elektrophoret. Reinheitsgrad ca. 100 %
(Behringwerke AG, Best.-Nr. DRHD);
- 7) 5,5-Diäthylbarbitursäurenatriumsalz zur Analyse
(Barbitalnatrium), MG = 184,2
(Reagenzien Merck, Nr. 6318);
- 8) Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat zur Analyse
(Reagenzien Merck, Nr. 6580);
- 9) Kaliumhydrogenphosphat nach Sörensen, MG = 136,1
(Reagenzien Merck, Nr. 4873);
- 10) 5 N-Salzsäure (Reagenzien Merck, Nr. 9970);
- 11) 2 N-Natronlauge (Reagenzien Merck, Nr. 9136);
- 12) Sephadex G 10, Lot. Nr. 9399;
- 13) Sephadex G 25, Lot. Nr. 8218;
- 14) Sephadex G 50, Lot. Nr. 7084
(Pharmacia Fine Chemicals, Schweden).

2.1.2.0. Puffer und Lösungen

- 1) 0,5 M Phosphatpuffer nach Sörensen (Stammlösung)
 KH_2PO_4 : 6,81 g/100 ml H_2O
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 44,5 g/500 ml H_2O
einstellen auf pH 7,5;

- 2) 0,05 M Phosphatpuffer: Puffer 1) 1 : 10 verdünnen;
- 3) 0,5%-Albumin-Phosphatpuffer-Gemisch:
z.B. 5 g Rinderserum-Albumin auf 1000 ml Puffer 2);
- 4) 0,1 M Na-Veronalpuffer nach Michaelis, pH 7,4:
20,61 g Barbitalnatrium auf 1000 ml H₂O;
- 5) 0,07 M Na-Veronalpuffer: 7 Volumina von Puffer 4)
auf 3 Volumina H₂O, einstellen auf pH 8,6;
- 6) 5%-Rinderalbumin-Lösung: 1 g Rinderalbumin auf 20 ml
Puffer 5);
- 7) 20%-Rinderalbumin-Lösung: 1 g Rinderalbumin auf 5 ml
Puffer 5);
- 8) Natriumbisulfit-Lösung: 10 mg auf 20 ml Puffer 2);
- 9) Kaliumjodid-Lösung: 100 mg auf 20 ml Puffer. 2);
- 10) Chloramin-T-Lösung: 20 mg auf 20 ml Puffer 2), un-
mittelbar vor Gebrauch ansetzen, lichtgeschützt auf-
bewahren;
- 11) Endverdünnung von synthetischem Humangastrin I:
1 µg / 10 µl Puffer 2).

2.1.3.0. Vorbereitung der Säulen für Chromatographie und Rechromatographie

Für die Chromatographie-Säule 5 g Sephadex G 10 in ca.
100 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer einrühren und mindestens
drei Stunden quellen lassen (wenn möglich über Nacht),
für die Rechromatographiesäule 8 g Sephadex G 25 und 8 g
Sephadex G 50 in ca. 200 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer ein-
rühren und quellen lassen.

Glasrohre reinigen, entfetten und trocknen. Den Auslauf
mit Glaswatte abdichten und eine Lage Glasperlen darüber-
schichten. Glasrohre senkrecht befestigen und mit 0,07 M
Na-Veronalpuffer vorspülen. Gel einfüllen und absetzen
lassen. Die G-10-Chromatographie-Säule soll die Maße
0,9 cm x 14,0 cm haben, die G-25/50-Rechromatographie-

Säule die Maße 1,2 cm x 47 cm. Nach dem Absetzen des Gels mit 5 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer nachwaschen, beide Säulen mit je 1 ml 5%-Rinderalbumin-Lösung beschichten und nochmals mit 20 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer nachwaschen. Die Chromatographie-Säule mit dem automatischen Fraktionsammler verbinden und die Tropfenzahl pro Fraktion auf ein Volumen von 0,6 ml einstellen. Die Rechromatographie-Säule bis zum Gebrauch mit einem Flüssigkeitsspiegel von ca. 2 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer bedecken.

2.1.4.0. Durchführung der Markierung

Im Original-Versandgefäß das ^{125}Jod -Natriumjodid (2 mCi ^{125}Jod in 0,004 ml) mit 40 μl 0,05 M Phosphatpuffer lösen und kurz zentrifugieren, davon die Hälfte (20 μl) in ein Reagenzglas pipettieren und die enthaltene Gesamtaktivität 30 Sekunden lang mit einem Geigerzähler (Digitaler Strahlungsmessplatz MS Str 610/1, Fa. Telefunken) messen. In das Reagenzglas dazugeben: 1 μg synthetisches Human-gastrin I, gelöst in 10 μl 0,05 M Phosphatpuffer, 10 μg Chloramin T, gelöst in 10 μl 0,05 M Phosphatpuffer. Dieses Gemisch 10 Sekunden lang schütteln, dann dazugeben: 10 μg Natriumbisulfit, gelöst in 20 μl 0,05 M Phosphatpuffer. Das gesamte Volumen mit einer Glaskapillar-Pipette auf die Chromatographie-Säule übertragen. Anschließend das Reaktionsgefäß und die Pipette mit 1 mg Kaliumjodid, gelöst in 200 μl 0,05 M Phosphatpuffer, spülen und die Spülflüssigkeit ebenfalls vorsichtig auf die Säule geben. Diesen Vorgang einmal wiederholen. Restaktivität in Reaktionsgefäß und Pipette messen. (Genaueres Markierungsschema siehe Kap. 2.1.6.0.).

2.1.5.0. Gelchromatographische Trennung

Die Elution über die Sephadex-G-10-Säule erfolgt mit 0,07 M Na-Veronalpuffer, pH 8,6. Das Eluat wird in 0,6-ml-Fractionen in 30 Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen, in die vorher zur Verhinderung von Adsorption je 0,01 ml 20%-Rinderalbumin-Lösung einpipettiert wurden. Die in jedem Reaktionsgefäß enthaltene Radioaktivität wird 30 Sekunden lang mit dem unter 2.1.4.0. genannten Geigerzähler gemessen.

Das so erhaltene Elutionsprofil zeigt einen $^{125}\text{Jod-Gastrin}$ - "peak" und einen $^{125}\text{Jodid}$ - "peak" (Abb.2).

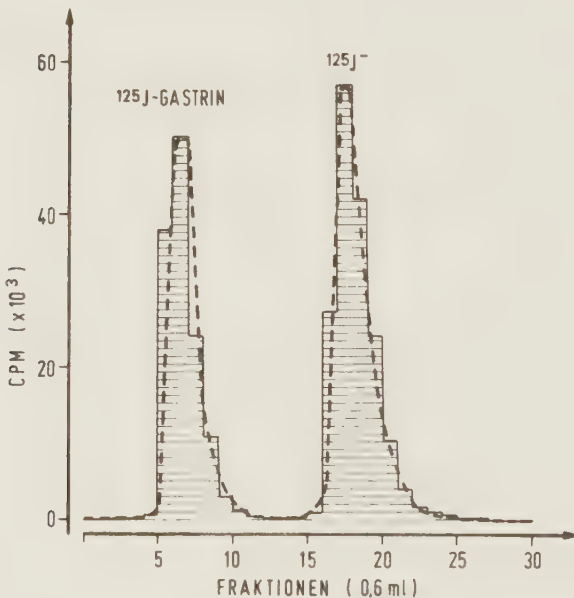


Abb. 2: Elutionsprofil des über Sephadex G 10 in $^{125}\text{Jod-Gastrin}$ und radioaktives Jodid getrennten Markierungsproduktes

Zur Rechromatographie gelangt das ^{125}Jod -Gastrin (Fraktionen 7 - 9 der Abb.2). Das Eluat wird in mit 20%-Rinderalbumin-Lösung (je 0,01 ml) beschickte Eppendorf-Reaktionsgefäße in 100 1-ml-Fraktionen gesammelt und ein Aliquot von jeder Fraktion (je 0,02 ml) in Plastik-Zählröhrchen einpipettiert. Die enthaltene Radioaktivität wird 30 Sekunden lang im Gamma-Zählgerät (Fa. Tracerlab, Belgien) gemessen. Das Elutionsprofil der Rechromatographie (Abb.3) zeigt einen homogenen ^{125}Jod -Gastrin-"peak", dem ein kleiner "damage-peak" bei Fraktion 30 - 40 der Abb.3 (unter 1 % der Gesamtaktivität) vorausgeht.

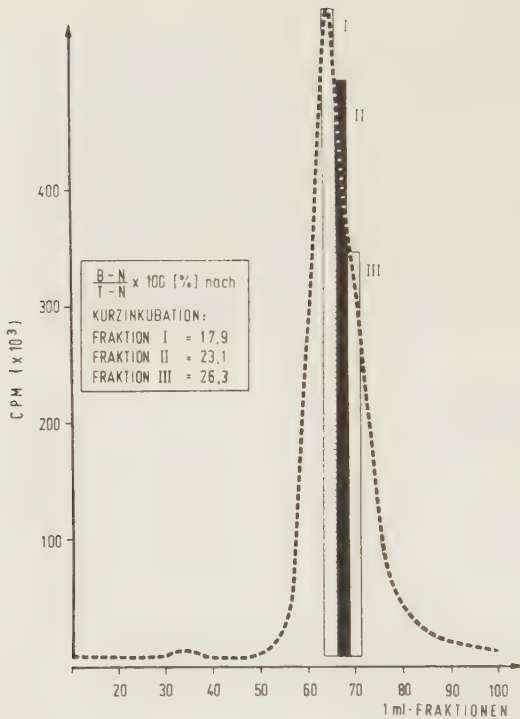


Abb. 3: Elutionsprofil des über Sephadex G 25/50 nachgereinigten ¹²⁵Iod-Gastrin. Optimales Bindungsverhalten am absteigenden Schenkel des "peaks" (Fraktion III).

Die Fraktionen mit den höchsten Impulsraten werden anschließend in drei Gruppen (Fraktionen I, II und III der Abb. 3) zusammengefaßt und die mittlere Aktivität der Fraktionen II und III errechnet. Bei der nachfolgenden

Über 8 Stunden durchgeführten Kurzinkubation (Einzelheiten s. Kap. 2.5.0. . und Kap. 2.6.0. .) zeigte sich, daß die Fraktionen I, II und III ein zunehmendes Bindungsvermögen für das Gastrin-Antiserum, d. h. eine zunehmende Reinheit des Tracers besitzen (Tab. 2).

Tab. 2: Markierungsbeispiel vom 24.9.

1-ml-Fraktion Nr.	Impulse/30 sec	Fraktion	$\frac{(B-N)}{(T-N)} \times 100$
.....			
60	120 263		
61	157 398		
62	198 019		
63	225 882		
64	247 852	I	17,9 (%)
65	267 832		
66	274 518		
67	262 590	II	23,1 (%)
68	243 564		
69	206 177		
70	177 041	III	26,3 (%)
71	150 886		
72	120 454		
73	96 021		
74	74 221		
75	57 231		
.....			

Der gewonnene Tracer der Fraktion III wird unmittelbar nach Abschluß der Markierung mit 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5, mit einem Gehalt an Rinderalbumin von 0,5 %, auf die endgültige Verdünnung gebracht. Diese wird so gewählt, daß bei Messung der Radioaktivität von 0,1 ml im Gamma-Zählgerät (Fa. Tracerlab, Belgien) Zählraten von ca. 10 000 pro Minute (cpm) erreicht werden. Nach dem Abfüllen des fertigen Tracers in 15-ml-Portionen in Reagenzgefäße wird er bei -20°C eingefroren.

2.1.6.0. Modifikationen der Gastrinmarkierung

Wir führten verschiedene Markierungen von Gastrin mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen durch. Dabei variierten wir die eingesetzten Mengen von Gastrin, ^{125}Jod -Natriumjodid, Chloramin T und Natriumbisulfit. Außerdem veränderten wir die Reaktionszeit. Als Hormonpräparat wurden synthetisches Humangastrin I (SHG I) der Firma ICI, "Human little Gastrin I" (HLG I) (GREGORY) * und synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH)* verwendet. Aufgrund der dabei gewonnenen Ergebnisse wählten wir die endgültige Modifikation der Gastrinmarkierung, die im Kap. 2.1.6.7. beschrieben wird.

* Herrn Prof. Dr. R.A.Gregory, Liverpool, und Herrn Prof. Dr. E.Wünsch, München, danken wir für die freundliche Überlassung der Gastrin-Präparationen.

2.1.6.1. Unterschiedliche Reaktionszeiten

SHG I (ICI)(μg)	1	1	1	1	1	1
^{125}Jod (mCi)	1	1	1	1	1	1
Chloramin T (μg)	5	5	5	5	5	5
Zeit (sec)	5	5	10	10	30	30
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (μg)	5	5	5	5	5	5
spez. Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I)	362	343	270	253	420	534
Bindungsvermögen	+	+	+	+	+	+

Es zeigte sich, daß Reaktionszeiten zwischen 5 Sekunden und 30 Sekunden vergleichbare Ergebnisse brachten. Die spezifische Aktivität lag bei diesen sechs Versuchen im Mittel bei $364 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I. Alle Tracer wiesen ein gutes Bindungsverhalten (+) mit dem verwendeten Gastrin-Antiserum 2604-(8) auf.

2.1.6.2. Verschiedene Chloramin-T-Konzentrationen

SHG I (ICI)(μg)	1	1	1	1
^{125}Jod (mCi)	1	1	1	1
Chloramin T (μg)	20	10	5	5
Zeit (sec)	5	5	5	5
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (μg)	5	5	5	5
spez. Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I)	270	426	343	362
Bindungsvermögen	+	+	+	+

Bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen zeigte sich kein Einfluß einer zwischen 5 μg und 20 μg veränderten Chloramin-T-Konzentration. Es kam jedesmal eine gute Bindung des Tracers mit dem Gastrin-Antiserum zustande. Wesentlich höhere Konzentrationen von Chloramin T führen zu einer Oxidation der Sulfhydrylgruppen am Gastrinmolekül (60). Wegen des somit zu erwartenden hohen "damage"-Anteils untersuchten wir nur die beschriebenen Chloramin-T-Konzentrationen.

2.1.6.3. Unterschiedliches Verhältnis ^{125}Jod zu Gastrin

SHG I (ICI) (μg)	0,25	0,5	1	1
^{125}Jod (mCi)	1	1	1	2
Chloramin T (μg)	5	5	10	10
Zeit (sec)	10	10	10	10
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (μg)	5	5	10	5
spez. Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I)	896	644	430	920
Bindungsvermögen	+	+	+	+

Eine Erhöhung der eingesetzten Menge von ^{125}Jod auf 2 mCi ergab eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf etwa das Doppelte der bei der routinemäßig verwendeten Modifikation mit 1 mCi ^{125}Jod erzielten Resultate (im hier gezeigten Beispiel 920 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I gegenüber 430 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I). Denselben Effekt hatte - bei gleichbleibenden ^{125}Jod -Anteilen - die Reduktion der eingesetzten Hormonmenge auf die Hälfte (0,5 μg) bzw. auf ein Viertel (0,25 μg) der sonst verwendeten Menge (1 μg). Im Beispiel zeigte sich

eine Zunahme der spezifischen Aktivität auf 644 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I bei Verwendung von 0,5 μg Gastrin bzw. auf 896 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I bei Einsatz von 0,25 μg SHG I.

Eine Verschiebung der Relation zwischen Gastrin und ^{125}Jod zugunsten des radioaktiven Isotops hat eine erhöhte spezifische Aktivität zur Folge. Das Bindungsvermögen des Tracers entspricht dem der oben angegebenen Markierungsmodifikationen.

2.1.6.4. Markierung von synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I (SHG I)(WÜNSCH)

SHG I (WÜNSCH)(μg)	1	1	1	1
^{125}Jod (mCi)	1	1	1	1
Chloramin T (μg)	100	100	5	10
Zeit (sec)	30	30	5	10
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (μg)	200	200	5	10
Spez. Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I)	450	475	343	520
Bindungsvermögen	Ø	Ø	Ø	Ø

Zu Beginn unserer Markierungsversuche setzten wir synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) ein (70).

Bei einer Reaktionszeit von 30 Sekunden wählten wir eine hohe Konzentration von Chloramin T (100 μg) und Natriumbisulfit (200 μg). Der bei diesen Markierungen gewonnene Tracer vermochte keine Bindung mit dem Gastrin-Antiserum 2604-(8) einzugehen (Ø).

Nachdem wir mit synthetischem Humangastrin I (ICI) gut reproduzierbare Markierungen durchführen konnten, führten

wir unter den standardisierten Bedingungen erneut Markierungsversuche mit synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) durch. Dabei setzten wir 1 μg Gastrin und 1 mCi ^{125}Jod ein. Die spezifische Aktivität lag bei 4 Markierungen im Bereich zwischen 343 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I und 520 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ SHG I, entsprechend den Ergebnissen der mit synthetischem Humangastrin I (ICI) durchgeführten Markierungen (s. Kap. 2.1.6.7.). Die Elutionsprofile der Chromatographie über eine Sephadex-G-10-Säule und der Rechromatographie über eine Sephadex-G-25/50-Säule waren identisch mit dem sonst beobachteten Profil (s. Abb. 2 und Abb. 3).

Damit konnte gezeigt werden, daß sich synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) bei der Markierung mit ^{125}Jod chromatographisch wie synthetisches Humangastrin I (ICI) verhält.

Die im Anschluß an die Markierung jeweils durchgeführte Kurzinkubation (8 Stunden) führte in keinem Fall zu einer meßbaren Bindung an das Gastrin-Antiserum 2604-(8). Das immunologische Verhalten von synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) wird demnach bei der radioaktiven Markierung mit ^{125}Jod so stark verändert, daß es als Tracer nicht verwendbar ist.

2.1.6.5. "Trace-Iodination"

Humangastrin I (μg)	5*	5*	5*	5**	5***
^{125}Jod (mCi)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Chloramin T (μg)	5	5	5	5	5
Zeit (sec)	30	10	20	30	30
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (μg)	5	5	5	5	5
spez. Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Gastrin)	31	21	52	21	36
Bindungsvermögen	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Die von STADIL und REHFELD beschriebene "Trace-Iodination" (60), bei der unter Verwendung von geringen Mengen ^{125}Jod nur monojodiertes Gastrin entstehen soll, ließ sich unter unseren Versuchsbedingungen nicht bestätigen. Bei der Verwendung von 5 μg Gastrin und 0,25 mCi ^{125}Jod (Verhältnis 20 : 1) ergaben sich sehr niedrige spezifische Aktivitäten von durchschnittlich 32 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Gastrin ($n = 5$). Die Veränderung der Reaktionszeit zwischen 10 und 30 Sekunden hatte auch hierbei keinen erkennbaren Einfluß. In keinem Fall war eine Bindung des Tracers an das Gastrin-Antiserum 2604-(8) zu erzielen (Ø). In Versuchen mit den Gastrinpräparationen von GREGORY und WÜNSCH ließen sich mit Hilfe dieser "Trace-Iodination" ebenfalls keine verwendbaren Gastrin-Tracer herstellen.

* = SHG I (ICI), ** = SHG I (WÜNSCH), *** = HLG I (GREGORY)

2.1.6.6. Verschiedene Natriumbisulfit-Konzentrationen

Zusätzliche Versuche mit verschiedenen Natriumbisulfit-Mengen zeigten, daß im Bereich zwischen 5 μg und 40 μg die Natriumbisulfit-Menge, die zum Stoppen der Markierungsreaktion verwendet wird, keinen Einfluß auf das Ergebnis der Markierung hat.

2.1.6.7. Endgültige Modifikation der Markierung

Unter Berücksichtigung der dargestellten Ergebnisse wählen wir die endgültige Modifikation der Markierung von synthetischem Humangastrin I (SHG I) (ICI) (Tab.3). Mit dieser lassen sich bei Verwendung von kleinen Reaktionsvolumina, geringer Chloramin-T-Menge und kurzer Reaktionszeit gut reproduzierbare spezifische Aktivitäten erreichen (Tab.4). Der Tracer weist eine gute Bindungsfähigkeit mit dem Gastrin-Antiserum auf.

Tab. 3: Markierungsschema (modifiziert nach GANGULI und HUNTER, 19)

1 μg SHG I (ICI)	10 μl
1 mCi $^{125}\text{J-Na}$	20 μl
10 μg Chloramin T	10 μl

Reaktionsvolumen	40 μl
------------------	------------------

nach 10 Sekunden:

10 μg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	20 μl
--	------------------

zum Nachwaschen:

2 mg KJ	400 μl
---------	-------------------

2.1.6.8. Berechnung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Aktivität wird im Anschluß an die gel-chromatographische Trennung des ^{125}Jod -Gastrin vom $^{125}\text{Jodid}$ berechnet. Dabei werden die Zählraten pro 30 sec. von Protein- und Salz-"peak" addiert und gleich 100 % gesetzt. Dann wird der prozentuale Anteil des ^{125}Jod -Gastrin-"peaks" berechnet.

Zusammen mit der bekannten eingesetzten Radioaktivität (1mCi) und der eingesetzten Hormonmenge (1 μg) läßt sich nun die spezifische Aktivität des Tracers nach der Formel

$$\frac{\text{Protein-"peak"(\%)} \times \text{Gesamtaktivität (in } \mu\text{Ci)} \times 10}{\text{eingesetzte Hormonmenge } (\mu\text{g})}$$

berechnen.

Tab. 4: Einzelergebnisse und Mittelwert der spezifischen Aktivität von 40 eigenen Markierungen, nach dem Markierungsschema in Tab. 3.

450	420	480	520
475	410	510	460
534	430	322	291
270	434	225	531
644	235	300	730
362	367	364	316
343	352	451	405
235	358	543	451
270	398	478	511
350	530	504	688

Mittlere spezifische Aktivität: 426,2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Gastrin

2.1.7.0. Haltbarkeit des markierten Humangastrin I

Wir untersuchten die Haltbarkeit des radioaktiv markierten synthetischen Humangastrin I (ICI) über einen Zeitraum bis zu 4 Wochen.

Dazu führten wir in Zeitabständen von jeweils einer Woche Rechromatographien über eine Sephadex-G-25/50-Säule durch. Der Tracer, der bei einer Markierung gewonnen wurde, lag in einer Endverdünnung von ca. 20 000 cpm bei -20°C eingefroren vor. Zur Rechromatographie wurde ein Aliquot von je 2 ml wieder auf Raumtemperatur gebracht. Die Vorbereitung der Rechromatographie-Säule und die Durchführung der Rechromatographie verliefen wie im Kap. 2.1.3.0. und 2.1.5.0. beschrieben. Als Beispiel wird hier das Verhalten des Tracers einer Markierung innerhalb eines Zeitraumes von 4 Wochen dargestellt (Abb.4).

Bei der ersten Rechromatographie des noch unverdünnten Tracers am Tage der Markierung (4.5.76) zeigte sich ein kleiner "damage-peak" und ein homogener "peak" für ^{125}Jod -Gastrin.

Aus dessen abfallendem Schenkel wurde der Tracer (Fraktion III) gewonnen (vergl. Abb. 3). Die nächsten Rechromatographien nach einer bzw. zwei Wochen ergaben neben einem "damage-peak" und dem ^{125}Jod -Gastrin-"peak" einen zunehmenden Anteil an ^{125}Jod -Salz. Bei der Rechromatographie nach 4 Wochen (4.6. in Abb.4) hatte die Radioaktivität entsprechend der Halbwertszeit von ^{125}Jod abgenommen. Außerdem war die Dissoziation des Tracers zu ^{125}Jod -Salz weiter fortgeschritten, sodaß der nach dem ^{125}Jod -Gastrin-"peak" auftretende $^{125}\text{Jodid}$ -"peak" an Größe zugenommen hatte.

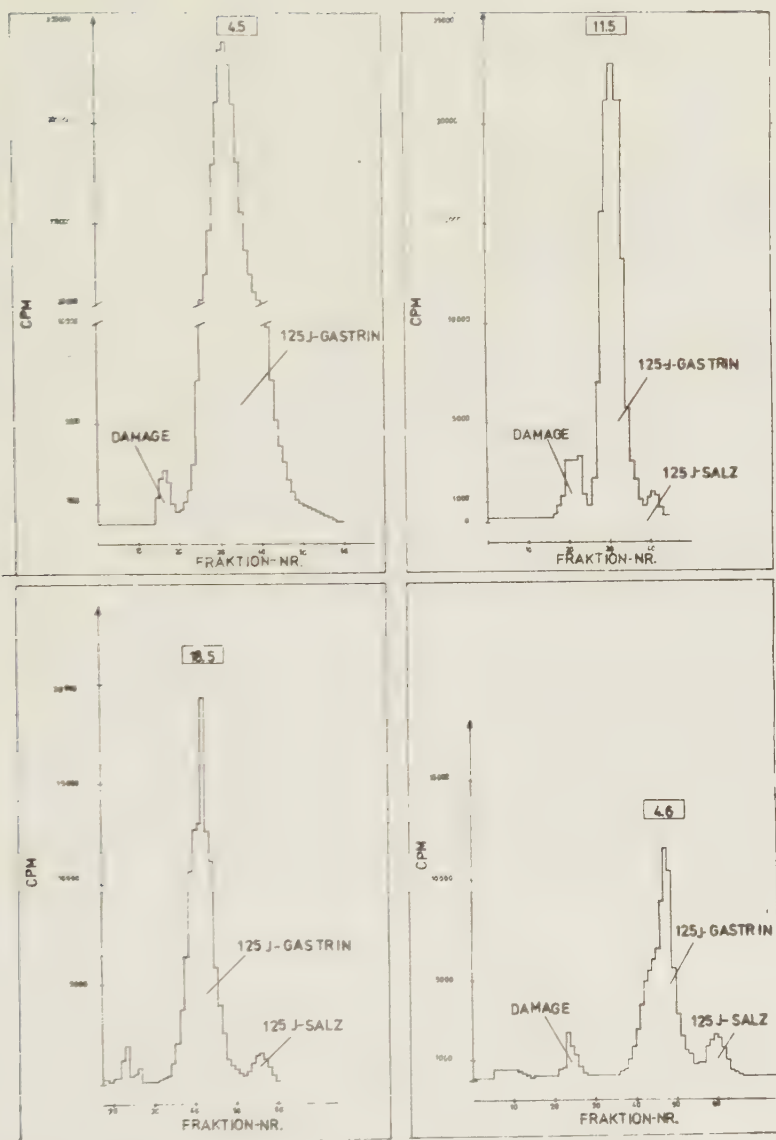


Abb.4: Elutionsprofile des am 4.5.76 markierten synthetischen Humangastrin I(ICI) bei Rechromatographie am 4.5., 11.5., 18.5. und 4.6.76.

2.1.8.0. Reproduzierbarkeit der Standardkurve mit ^{125}Jod -Gastrin (ICI) einer Markierung

Die zeitlich begrenzte Haltbarkeit des Tracers läßt befürchten, daß bei längerer Verwendung des bei einer Markierung hergestellten ^{125}Jod -Gastrin die Standardkurven einen veränderten Verlauf aufweisen.

Mit weiteren Untersuchungen wollten wir zeigen, daß in dem von uns gewählten Verwendungszeitraum für den Tracer von 4 Wochen die Bindungsfähigkeit des Tracers und die Qualität der Standardkurven hinreichend erhalten bleiben. Dazu verglichen wir 5 Standardkurven, die mit dem gleichen Tracer (Fraktion III) einer Markierung angesetzt waren. Die 5 Ansätze wurden 3, 10, 17, 24 und 38 Tage nach der Markierung durchgeführt (das methodische Vorgehen ist in Kap. 2.6.0.0. beschrieben).

Die Bindung des Tracers an das Gastrin-Antiserum lag bei der ersten Standardkurve bei 34,8 % (B_0/T) und nahm im Laufe von 4 Wochen auf 26,7 % (B_0/T) ab. Der Verlauf der Standardkurve blieb im untersuchten Zeitraum völlig gleich. Insbesondere war kein Verlust an Steilheit des Kurvenverlaufes zu beobachten (Abb. 5).

Das ^{125}Jod -Gastrin (ICI) ist demnach geeignet, in einem Zeitraum von mindestens 4 Wochen als Tracer die Erstellung von Standardkurven mit gleichbleibender Qualität zu ermöglichen.

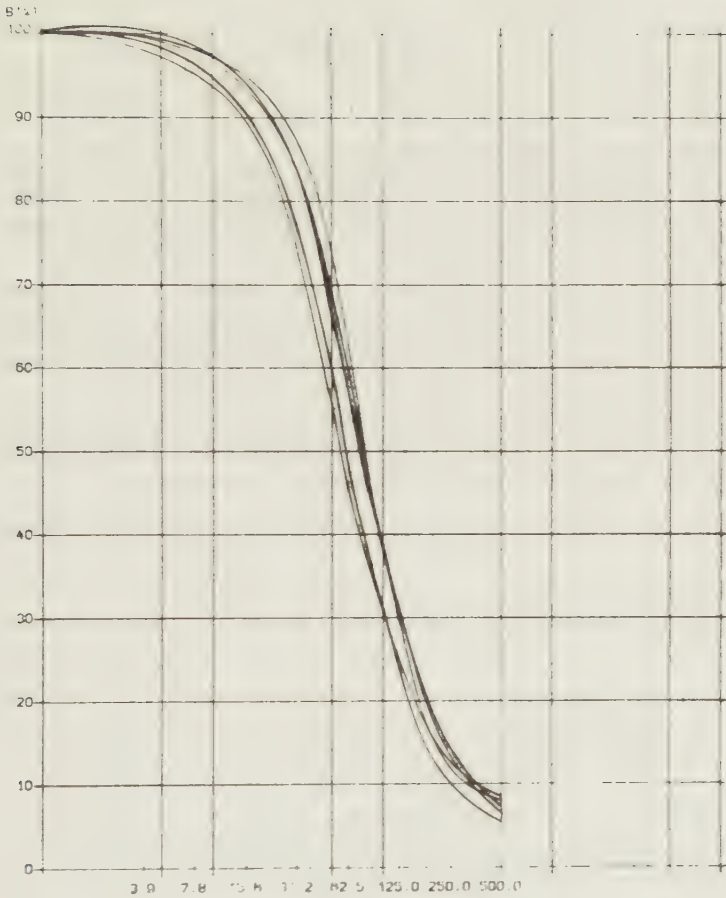


Abb. 5: 5 Standardkurven, erstellt während eines Zeitraumes von 4 Wochen mit Tracer einer Markierung. Auf Ordinate sind die Bindungen (B(%)) als $\frac{B-N}{T-N} \times 100 \%$ und auf der Abszisse die Konzentrationen des als Standard verwendeten (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) in pg/ml angegeben.

2.2.0.0. Gastrin-Antiserum

2.2.1.0. Einführung

Die Genauigkeit und Empfindlichkeit einer radioimmunologischen Bestimmungsmethode hängen in hohem Maße von den Eigenschaften des verwendeten Antiserums gegen das zu bestimmende Antigen - in unserem Falle Gastrin - ab. Für die Qualität eines Antiserums ist auch seine Bindungsfähigkeit (Avidität) und seine Spezifität bedeutend.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Gastrinbestimmungen verwendeten wir das Antiserum 2604-(8), welches uns Herr Prof. Dr. J. Rehfeld, Aarhus, Dänemark, freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Dieses vorzügliche Antiserum war von Rehfeld et al. (58) bereits genauestens charakterisiert und seine Verwendbarkeit für die radioimmunologische Gastrinbestimmung beschrieben worden (61).

2.2.2.0. Ermittlung der Endverdünnung

2.2.2.1. Einführung

Eine Antiserum-Konzentration, die etwa 50 % der eingesetzten Menge an ^{125}Jod -Gastrin binden kann, ist für die radioimmunologische Hormonbestimmung ausreichend. Die für die praktische Verwendung in unserem Radioimmunoassay beste Antiserum-Konzentration wurde durch eine Titerkurve mit Gastrin-Antiserum 2604-(8) gefunden.

2.2.2.2. Reagenzien

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, mit 2 g/l Humanalbumin
- 2) CEA- ^{125}Jod -Gastrin (IDW-Kit, Nr. ET 66401)
- 3) Gastrin-Antiserum 2604-(8), 1 : 200 verdünnt (REHFELD)
- 4) Kaninchenserum, verdünnt, 20 %, als Kopräzipitat

2.2.2.3. Methodik

Das Gastrin-Antiserum 2604-(8) wurde in aufeinanderfolgenden Schritten verdünnt: 1 : 2 000; 1 : 4 000; 1 : 8 000; 1 : 16 000; 1 : 32 000; 1 : 64 000. Jeweils 0,1 ml wurde sechsfach bestimmt. Dazu wurde in jedes Reaktionsgefäß einpipettiert: 0,6 ml Na-Veronalpuffer, 0,1 ml Gastrin-Antiserum 2604-(8) der entsprechenden Verdünnungsstufe, 0,1 ml CEA-¹²⁵Jod-Gastrin und 0,05 ml Kaninchenserum als Kopräzipitat (Gesamtvolumen = 0,85 ml).

Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 4°C erfolgte Zugabe des präzipitierenden zweiten Antikörpers (vergl. Kap. 2.4.) und nach weiteren 5 Stunden Inkubation bei 4°C die Trennung des Antikörper-gebundenen vom freien Gastrin durch Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes.

2.2.2.4. Ergebnis

Die verschiedenen Antiserum-Konzentrationen ergaben unterschiedliche Bindungsraten mit dem ¹²⁵Jod-Gastrin. Es zeigte sich, daß das kommerzielle CEA-Gastrin als Tracer nur geringe Bindungsraten bei Antiserum-Überschuß erbringt. Daher lag der höchste erreichte Wert bei 53,1 % (B_0/T) bei einer Antiserum-Konzentration von 1 : 2 000/0,1 ml. Bei einer Konzentration von 1 : 8 000/0,1 ml wurde noch 22,5 % Bindung erreicht. Bezogen auf das gesamte verwendete Volumen von 0,85 ml entsprach diese Konzentration einer Endverdünnung von 1 : 68 000. (Tab. 5).

Tab. 5: Bindungsraten des Gastrin-Antiserums 2604-(8)
mit einem qualitativ minderwertigen kommerziellen
Tracer (24 Stunden Inkubationszeit).

Verdünnung/0,1 ml	Verdünnung/0,85 ml	Bindung (B_o/T)
1 : 2 000	1 : 17 000	53,1 %
1 : 4 000	1 : 34 000	41,9 %
1 : 8 000	1 : 68 000	22,5 %
1 : 16 000	1 : 136 000	13,4 %
1 : 32 000	1 : 272 000	0,8 %
1 : 64 000	1 : 544 000	0,5 %

2.2.3.0. Vergleich verschiedener Antiserum-Chargen

Wir führen unsere radioimmunologische Gastrinbestimmung mit dem von Rehfeld zur Verfügung gestellten Gastrin-Antiserum 2604-(8) vom Kaninchen durch. Die Endverdünnung, in der das Serum eingesetzt wird, beträgt 1 : 72 000/0,9 ml. Dankenswerterweise hat uns Herr Prof. Dr. J.Rehfeld auch seine Chargen 2604-(9) und 2604-(10) überlassen und dadurch die Weiterführung der Gastrinbestimmungen ermöglicht.

Wir erstellten zwei Antiserum-Titrationskurven mit Gastrin-Antiserum 2604-(9) und Gastrin-Antiserum 2604-(10). Dabei zeigte sich ein unterschiedlich hoher Antikörper-Titer, der eine unterschiedliche Endverdünnung notwendig macht. Bei Antiserum-Überschuß wurden mit Tracer aus eigener Markierung - im Gegensatz zum kommerziellen Tracer (Tab. 5) - Bindungsraten von über 80 % erzielt (Abb. 6). Trotz verschiedener

Avidität lassen sich bei geeigneter Wahl der Endverdünnung mit diesen Antiseren gut reproduzierbare Gastrinbestimmungen durchführen.

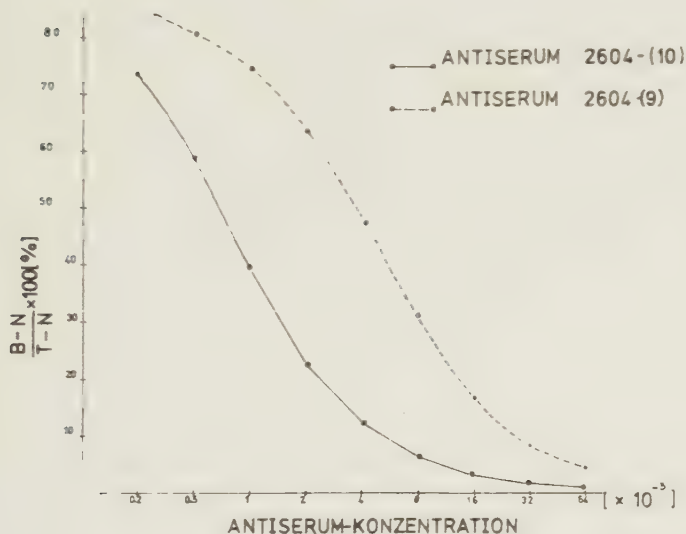


Abb. 6: Antiserum-Titer-Kurven von Gastrin-Antiserum 2604-(9) und 2604-(10).

Zusätzlich verglichen wir das Antiserum 2604-(8) und das zu einem späteren Zeitpunkt gewonnene Antiserum 2604-(10). Es war zu zeigen, daß diese beiden Antiseren trotz unterschiedlicher Endverdünnung vergleichbare radioimmunologische Meßergebnisse liefern.

Dazu erstellten wir zwei Standardkurven. Einmal setzten wir Gastrin-Antiserum 2604-(8) in der Endverdünnung von 1 : 72 000 ein; einmal verwendeten wir Antiserum 2604-(10) in der Endverdünnung 1 : 13 500. Mit beiden Antiseren be-

stimmen wir außerdem die Castrinspiegel bekannter Referenzseren.

Die mit Antiserum 2604-(10) erstellte Standardkurve zeigte einen geringfügig flacheren Verlauf als die Kurve mit Antiserum 2604-(8) (Abb. 7).

Antiserum 2604-(8):

Untere Nachweisgrenze = 8 pg/ml, 50 %-Intercept = 64,5 pg/ml,

Referenzserum im niedrigen Bereich = 28,9 pg/ml,

Referenzserum im hohen Bereich = 191,8 pg/ml.

Antiserum 2604-(10):

Untere Nachweisgrenze = 8 pg/ml, 50 %-Intercept = 67,7 pg/ml,

Referenzserum im niedrigen Bereich = 27,2 pg/ml,

Referenzserum im hohen Bereich = 248,0 pg/ml.

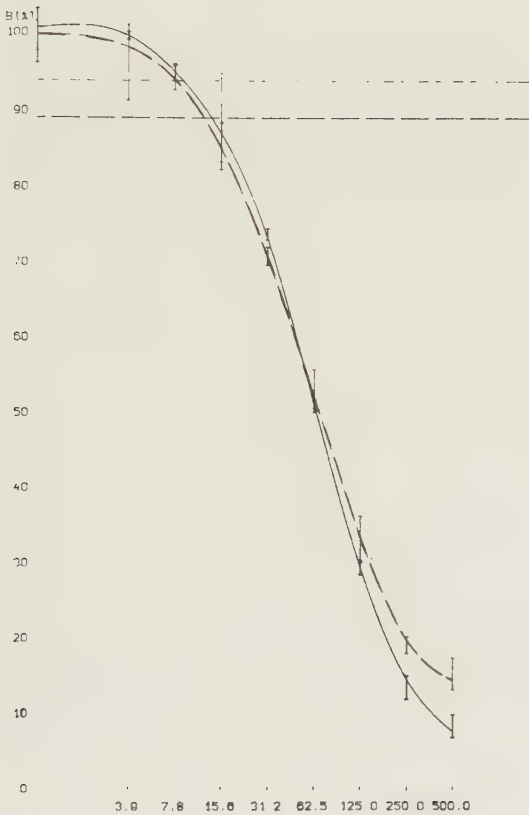


Abb. 7: Standardkurven mit Gastrin-Antiserum 2604-(8) (—) und Gastrin-Antiserum 2604-(10)(-----). Auf der Ordinate sind die Bindungen (B(%)) als $\frac{B-N}{T-N} \times 100$ (%) und auf der Abszisse die Konzentrationen des (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) in pg/ml angegeben.

2.3.0.0. Standard

2.3.1.0. Einführung

Seit der Reindarstellung des Gastrinmoleküls und der Aufklärung der Aminosäuresequenz sind verschiedene Gastrinpräparate extrahiert und synthetisiert worden. Um synthetisches Gastrin als Standard für die Erstellung einer Eichkurve bei der radioimmunologischen Gastrinbestimmung einsetzen zu können, muß man ermitteln, ob es sich radioimmunologisch identisch verhält wie natürliches Serumgastrin des Menschen. Es ist dabei nicht notwendig, daß synthetisches und natürliches Hormon in ihrer biologischen oder chemischen Wirksamkeit vollkommen identisch sind (11). Wir verglichen drei verschiedene Gastrin-Präparationen mit einer Verdünnungskurve aus menschlichem Serum.

2.3.2.0. Reagenzien

- 1) Human little Gastrin I, aus einem Zollinger-Ellison-Tumor extrahiert (GREGORY),
 - 2) synthetisches Humangastrin I (ICI)
 - 3) synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH).
- Zusätzlich wurden Serum einer Patientin (R.S.) mit hohem Gastrinspiegel bei perniziöser Anämie und die Kap. 2.6. beschriebenen Reagenzien verwendet.

2.3.3.0. Herstellen der Standardlösungen

2.3.3.1. Human little Gastrin I (GREGORY)

Es liegt als Stammlösung mit $3 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ vor. Daraus wird in mehreren Schritten eine Ausgangs-Konzentration von 500 pg/ml hergestellt. Durch wiederholte 1 : 2-Verdünnung mit $0,02 \text{ M}$

Na-Veronalpuffer, der 4 % Humanalbumin enthält, entsteht die Verdünnungsreihe 500/250/125/62,5/31,2/15,6/7,8/3,9 pg/ml.

2.3.3.2. Synthetisches Humangastrin I (ICI)

Es liegt als Stammlösung mit 10 µg/20 µl vor. Daraus wird ebenfalls in 5 Schritten eine Ausgangskonzentration von 500 pg/ml hergestellt und durch wiederholte 1 : 2-Verdünnung die 8 Konzentrationen 500/250/125/62,5/31,2/15,6/7,8/3,9 pg/ml gewonnen.

2.3.3.3. Synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH)

Dieses synthetische Gastrin liegt als Stammlösung mit 2 µg/20 µl vor. Es wird in 4 Schritten auf 500 pg/ml verdünnt:

- 1) 20 µl SHG I + 80 µl 0,02 M Na-Veronalpuffer = 2 µg/100 µl,
- 2) diese 100 µl + 9,9 ml Puffer = 20 µg/100 µl,
- 3) davon 1 ml + 49 ml Puffer = 4 000 pg/ml,
- 4) diese 50 ml + 350 ml Puffer = 500 pg/ml.

Die so erhaltene Gebrauchslösung (400 ml) mit 500 pg/ml wird nun in einer Verdünnungsreihe auf sieben weitere Konzentrationsstufen verdünnt:

- 1 Teil 500 pg/ml + 1 Teil Puffer = 250 pg/ml,
1 Teil 250 pg/ml + 1 Teil Puffer = 125 pg/ml u.s.w.

Die Verdünnungsreihe enthält folgende 8 Werte:

500/250/125/62,5/31,2/15,6/7,8/3,9 pg/ml.

Es erweist sich als zweckmäßig, diese großen Volumina in 1-ml-Portionen in Plastikgefäßen bei -20°C einzufrieren, um Veränderungen des Gastrin-Standards durch häufiges Auftauen und Wiedereinfrieren zu vermeiden.

2.3.3.4. Serum-Verdünnungskurve

In Vorversuchen wurde der Serum-Gastrinspiegel der Patientin R.S. mit >500 pg/ml ermittelt. Durch wiederholte 1 : 2-Verdünnung entsteht eine Verdünnungsreihe mit 8 Meßpunkten.

2.3.4.0. Durchführung der Vergleichsuntersuchung

Die Methode der radioimmunologischen Gastrinbestimmung und die Auswertung der erhaltenen Kurven ist im Kap. 2.6. beschrieben.

2.3.5.0. Ergebnis

Die drei Gastrin-Standardpräparate verhalten sich radioimmunologisch identisch wie natürliches menschliches Serumgastrin. Sie sind daher alle für unseren Radioimmunoassay geeignet. Die beste Übereinstimmung mit der Serum-Verdünnungskurve ergab die Standardkurve mit synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I(WÜNSCH)(Abb. 8), welches - im Gegensatz zum synthetischen Humangastrin I (ICI) - chromatographisch rein ist (71). Wir verwenden dieses Gastrin für unsere Messungen als Standardpräparat.



—— Standardkurve (SHG I Wünsch)
----- Serum - Verdünnungskurve (Pat. R.S.)

Abb. 8: Vergleich von einer Standardkurve mit synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) und einer Serum-Verdünnungskurve (Pat. R.S.). Auf der Ordinate sind die Bindungen als $\frac{B-N}{T-N} \times 100$ (%) angegeben.

2.4.0.0. Zweiter Antikörper

2.4.1.0. Einführung

Für die Trennung des Antikörper-gebundenen ("bound") vom nicht gebundenen ("free") Gastrin sind verschiedene Methoden beschrieben worden (8, 11, 55, 61). Unter anderem werden Gelfiltration, Ammoniumsulfat-Präzipitation und Adsorption an anorganische Anionen-Austauscher oder Aktivkohle benutzt. Einige Autoren (10, 32, 49, 50) trennen "bound" und "free" mit Hilfe eines präzipitierenden zweiten Antikörpers. Diese sog. Doppel-Antikörper-Methode beruht auf dem bekannten Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei als Antigen der Gastrinantiserum-Gastrin-Komplex und als Antikörper der Fällungsreaktion der zweite Antikörper miteinander ein Präzipitat bilden (11, 33).

Reaktion I:

$AK\ 1 + Gastrin = AK-Gastrin("bound") + Gastrin("free"),$

Reaktion II:

$AK-1-Gastrin + AK\ 2 + Gastrin = Gastrin("free") + AK-1-Gastrin-AK-2\ (Präzipitat)(11).$

Da das Gastrin-Antiserum 2604-(8) bei Kaninchen gewonnen wurde (58), verwenden wir als präzipitierenden zweiten Antikörper ein Antikaninchen-Gammaglobulin vom Esel (Fa. Wellcome). Zur Bildung des Präzipitates ist eine bestimmte Konzentration von Kaninchen Serum pro Probe nötig (10). Die verwendete Menge Gastrin-Antiserum reicht hierzu nicht aus. Daher geben wir zu jeder Probe als "Ko-Präzipitat" reines Kaninchen-Gammaglobulin. Die benötigte Menge Gammaglobulin und die erforderliche Konzentration des zweiten Antikörpers wurden in Vorversuchen aufeinander abgestimmt:

2.4.2.0. Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, 0,2 g Humanalbumin/100ml
- 2) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, 4 g Humanalbumin/100 ml
- 3) 125 Jod-Gastrin (SHG I, ICI, eigene Markierung)
- 4) Gastrin-Antiserum 2604-(8)
- 5) Gammaglobulin vom Kaninchen, lyophilisiert, rein (Serva)
- 6) anti-rabbit precipitating serum, donkey (Wellcome, Charge Nr. K 8135).

2.4.3.0. Methode

Das Kaninchen-Gammaglobulin wird in 0,02 M Na-Veronalpuffer 1) gelöst: 0,2 mg in 0,5 ml Puffer (entspricht 20 μ g in 50 μ l). Aus dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe hergestellt mit folgenden Werten (jeweils pro 50 μ l):

20 / 15 / 10 / 7,5 / 5 / 3,75 / 2,5 / 1,87 / 1,25 / 1 μ g.

Dann werden B₀- und N-Werte pipettiert. Dabei setzt sich das Gesamtvolumen von 0,8 ml aus folgenden Anteilen zusammen:

- B₀-Werte: 0,45 ml Puffer (0,2 g Albumin/100 ml)
 0,1 ml Gastrin-Antiserum (1 : 8 000 verdünnt)
 0,05 ml Kaninchen-Gammaglobulin
 0,2 ml Puffer (4 g Albumin/100 ml)
- N-Werte: 0,55 ml Puffer (0,2 g Albumin/100 ml)
 0,05 ml Kaninchen-Gammaglobulin
 0,2 ml Puffer (4 g Albumin/100 ml)

Nach der Zugabe von 0,1 ml 125 Jod-Gastrin folgt eine Inkubation bei 4°C für 24 Stunden. Dann wird der zweite Antikörper in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben. Diese Konzentrationen wurden vorher durch Verdünnung mit 0,02 M

Antikörper in Verhältnis 1 : 48 (nach Angabe des Herstellers), 1 : 32 und 1 : 16 hergestellt. Für die 10 verschiedenen Gammaglobulin-Konzentrationen werden jeweils die drei Antikörper-Konzentrationen eingesetzt, wobei insgesamt 30 B₀-Werte und 30 N-Werte (je dreifach) bestimmt werden. Nach einer Inkubation von 8 Stunden bei 4°C erfolgt die Trennung des Antikörper-gebundenen vom freien Gastrin und die Messung der Radioaktivität.

2.4.4.D. Ergebnis

Bei der geringen Verdünnung von 1 : 16 des zweiten Antikörpers verläuft die Fällungsreaktion auf einem gleichmäßig hohen Niveau, was auf ein Einfluß der Gammaglobulin-Konzentration zu erkennen ist. Erst bei Unterschreiten von 3,75 µg Gammaglobulin Probe ist die Ausbeute deutlich niedriger. - Die mittlere Verdünnung von 1 : 32 zeigt einen ausgeprägten Bindungs-Gipfel im Bereich zwischen 1 µg und 10 µg Gammaglobulin auf, der höchste Punkt liegt bei 7 µg. - Die niedrigste Konzentration des zweiten Antikörpers von 1 : 48 zeigt im Bereich von 2 bis 7 µg Gammaglobulin einen maximalen Bindungsgrad und einen steilen Abfall der erreichbaren Bindung bei höheren Konzentrationen des Gammaglobulins (Abb. 9).

Wir wählen daher eine Konzentration von 7 µg Gammaglobulin als Probe, die ein Maximum der Verdünnung des zweiten Antikörpers erlaubt.

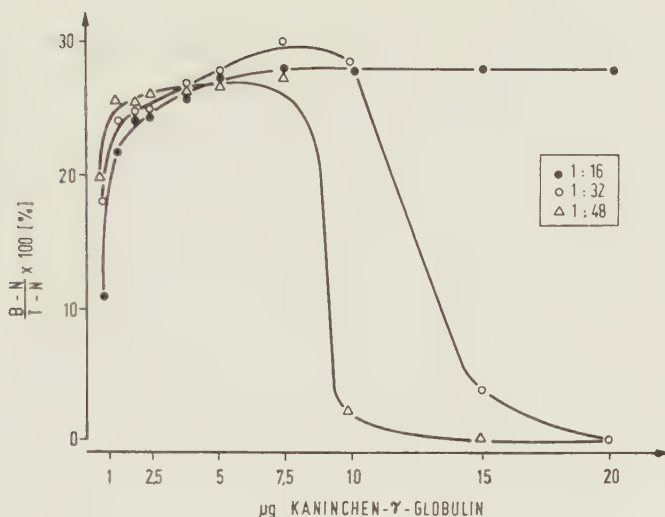


Abb. 9: Bindungsraten mit dem präzipitierenden zweiten Antikörper (Charge K 8135 in den Verdünnungen 1 : 16, 1 : 32 und 1 : 48) bei Verwendung unterschiedlicher Kaninchen-Gammaglobulin-Konzentrationen.

2.4.5.0. Vergleich von zwei Chargen des zweiten Antikörpers

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, daß sich verschiedene Chargen des zweiten Antikörpers, die nach Angaben des Herstellers entsprechend unterschiedlich verdünnt wurden, bei Verwendung von gleichbleibenden Konzentrationen des Ko-Präzipitates in ihrem Präzipitationsverhalten gleichen. Dazu setzten wir in einem Versuch mehrere B_0 - und N-Werte an. Die Methode ist in Kap. 2.4.3.0. beschrieben. Als zweiten Antikörper verwendeten wir das "anti-rabbit precipitat-

ing serum, donkey" Charge K 7794 in der Verdünnung 1 : 25, und Charge K 8135 in der Verdünnung von 1 : 32 (jeweils 0,2 ml). Als Ko-Präzipitat verwendeten wir Kaninchen-Gammaglobulin (Fa. Serva) in Konzentrationen von 2 μg bis 20 μg pro 50 μl sowie Kaninchenserum (eigene Produktion) in Dosen von 0,1 μl bis 1,0 μl pro 50 μl (entsprechend ca. 2 μg bis 20 μg Gammaglobulin). Nach Ablauf der üblichen Inkubationszeiten, Trennung der freien und gebundenen Radioaktivität und Zählen der Impulse erfolgte die Berechnung der gewonnenen Bindungsraten (B_0/T). Dabei zeigte sich ein gleiches Verhalten beider Chargen des zweiten Antikörpers bei den gewählten unterschiedlichen Konzentrationen von Kaninchenserum und Kaninchen-Gammaglobulin (Abb. 10).

Bei Verwendung von Kaninchenserum als Ko-Präzipitat lag die Bindung in einem Bereich zwischen 0,1 μl und 0,3 μl am höchsten (bei 32,7 %). Die Charge K 7794 zeigte ein geringfügig, nicht signifikant besseres Präzipitationsvermögen als die Charge K 8135.

Bei Verwendung von Kaninchen-Gammaglobulin als Ko-Präzipitat lag die höchste Bindung (34,2 %) bei Mengen von 3 μg bis 7 μg Gammaglobulin vor. Auch hier ergab die Charge K.7794 geringfügig bessere Ergebnisse als Charge K 8135 (Abb. 10).

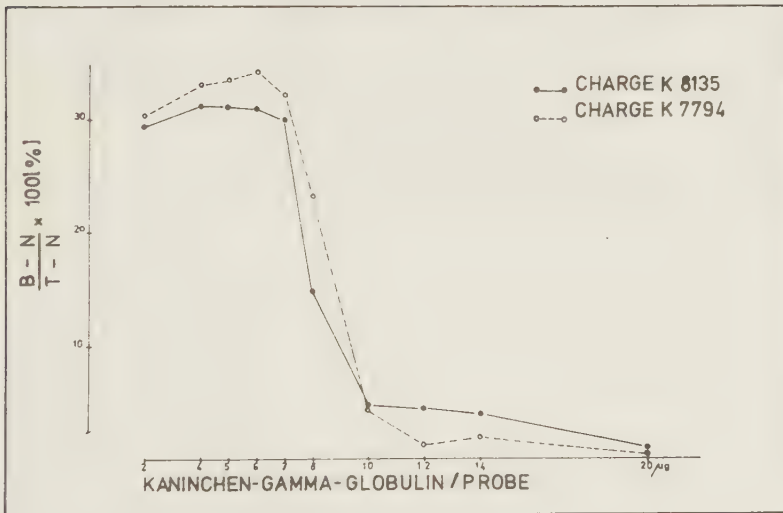
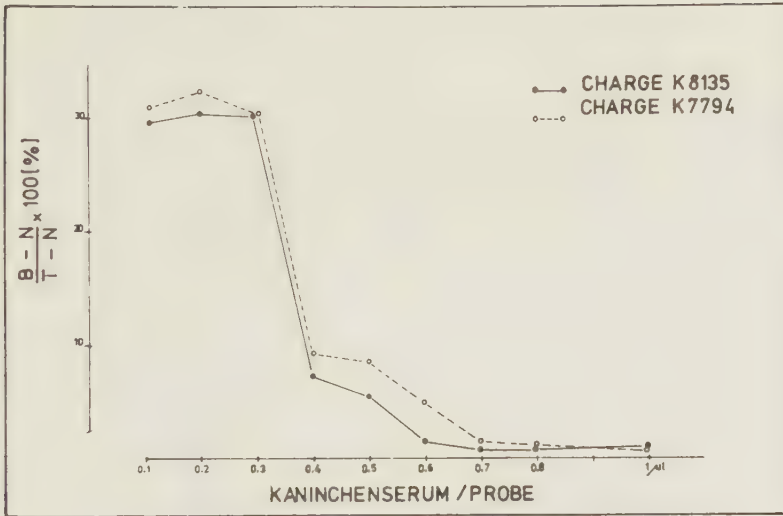


Abb. 10: Bindungsraten mit Charge K 7794 (Verdünnung 1 : 25) und Charge K 8135 (Verdünnung 1 : 32) des zweiten Antikörpers, bei Verwendung von Kaninchen-Serum (obere Abb.) und Kaninchen-Gammaglobulin (untere Abb.) als "Ko-Präzipitat".

2.4.6.0. Kinetik der Fällungsreaktion

Dazu setzten wir mehrere B_0 - und N-Werte an. Diese wurden nach einer Vorinkubation von 24 Stunden bei 4°C und einer Erstinkubation von 24 Stunden bei 4°C mit der Charge K 8135 des zweiten Antikörpers und mit $7\text{ }\mu\text{g}$ Kaninchen-Gammaglobulin pro Probe bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung des zweiten Antikörpers betrug nach Angaben des Herstellers $1 : 32$ in $0,02\text{ M}$ Na-Veronalpuffer, pH 7,4 ($0,2\text{ g}$ Humanalbumin/ 100 ml).

Nach Inkubationszeiten von 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24 und 48 Stunden wurde die Trennung der freien und Antikörpergebundenen Radioaktivität mittels Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes vorgenommen. Die zum jeweiligen Zeitpunkt erreichte Bindungsrate (B_0/T) wurde berechnet. Die Kinetik der Präzipitationsreaktion zeigt einen raschen Ablauf in den ersten Stunden. Eine weitgehend vollständige Reaktion ist nach etwa 10 Stunden erreicht. Bis zu einer Inkubationsdauer von 48 Stunden ist nur noch eine geringe Steigerung der erreichbaren Bindungsraten zu sehen (Abb. 11).

Wir wählten aufgrund dieser Ergebnisse eine Zeitdauer von 16 Stunden für die Zweitinkubation.

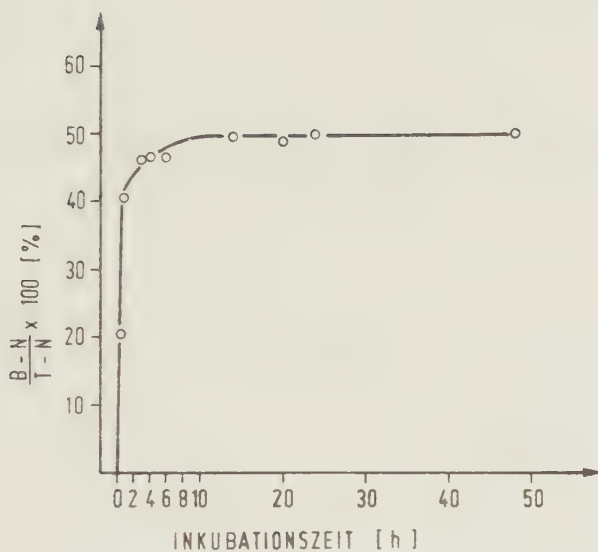


Abb. 11: Kinetik der Fällungsreaktion mit dem zweiten Antikörper, Charge K 8135, bei 4°C.

2.5.0.0. Inkubationsbedingungen

2.5.1.0. Kinetik von Gastrin-Antiserum 2604-(8)

Viele Autoren (23, 28, 33, 61) geben als Inkubationstemperatur, bei der die Bindungsreaktion zwischen Gastrin und Gastrin-Antiserum am schnellsten und vollständigsten abläuft, 4°C an. Wir untersuchten den Temperatureinfluß auf den Reaktionsablauf bei 4°C und bei 20°C, und wollten dabei gleichzeitig die Dauer bis zum Beginn einer meßbaren Reaktion und bis zum Erreichen des Gleichgewichtes feststellen.

2.5.1.1. Reagenzien

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4; 0,2 g Humanalbumin/
100 ml
- 2) CEA¹²⁵Jod-Gastrin (IDW-Kit, Nr. ET 66401)
- 3) Gastrin-Antiserum 2604-(8)
- 4) Kaninchenserum, verdünnt, 20 %
- 5) anti-rabbit precipitating serum, donkey (Wellcome)

2.5.1.2. Methode

Mehrere B₀- und N-Werte werden pipettiert. Die einzelnen Proben bestehen aus 0,8 ml Puffer, 0,1 ml ¹²⁵Jod-Gastrin, 0,05 ml Kaninchenserum; die B₀-Werte enthalten 0,1 ml Gastrin-Antiserum 2604-(8).

Eine Hälfte der Proben wird anschließend bei 4°C, die andere Hälfte bei 20°C (Raumtemperatur) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten von 30 Minuten, 1, 2, 3, 5, 10, 14, 24, 36, 48 und 72 Stunden werden die jeweiligen Proben in Dreiergruppen entnommen und mit flüssigem Stickstoff

(Siedepunkt bei $-195,8^{\circ}\text{C}$) schockgefroren und so die Antigen-Antikörper-Reaktion zum Stillstand gebracht. Anschließend werden alle Proben gemeinsam weiterbehandelt. Nach Zugabe von je 0,2 ml zweitem Antikörper folgt erneut Inkubation bei 4°C für 16 Stunden, anschließend Trennung der freien und gebundenen Radioaktivität und Berechnung der erzielten Bindungsraten.

2.5.1.3. Ergebnis

Bei 4°C nimmt die Bindungsrate (B_0/T) von 46 % nach 30 Minuten auf 59 % nach 72 Stunden zu. Dies entspricht einer relativen Zunahme um 22 % von 78 % auf 100 % der maximal erreichbaren Bindung. Das weitgehend vollständige Reaktionsgleichgewicht ist nach 20 Stunden erreicht. Bei 20°C verläuft die Reaktion in gleicher Weise, aber auf einem niedrigeren Niveau. Die Bindungsrate nimmt von 32 % nach 30 Minuten auf 53 % nach 72 Stunden zu. Die höchste bei 20°C erreichte Bindung liegt um 11 Rel.% niedriger als die bei 4°C erreichte (Abb. 12).

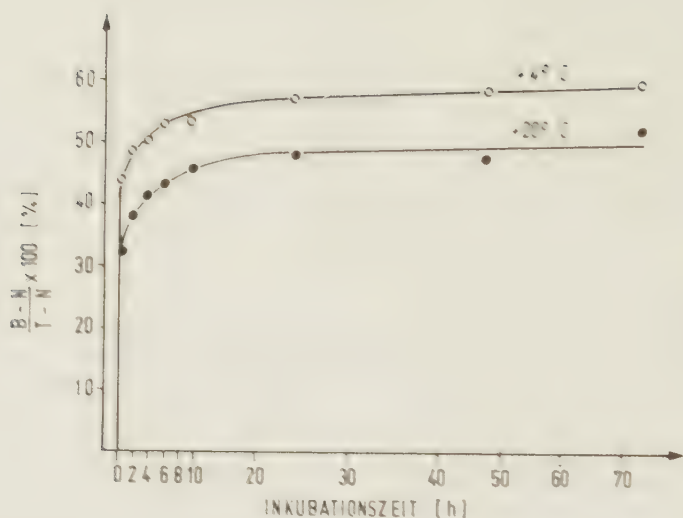


Abb. 12: Kinetik des Gastrin-Antiserum 2604-(8) getestet bei 4°C und bei 20°C.

2.2.2.2. pH-Wert

Der pH-Wert des Inkubationsmediums, bei dem die besten Bindungsraten erzielt werden, liegt für den Gastrin-Radioimmunoassay zwischen 7 und 9 (61). Manche Autoren geben für ihre Bestimmungsmethode Werte von 8,4 (28) bzw. 8,6 (21) als pH-Optimum an.

Bei unseren Bemühungen um serumähnliche Inkubationsbedingungen untersuchten wir den Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration im Puffersystem. Das Ziel des Versuches war, die Brauchbarkeit eines serumähnlichen pH-Wertes von 7,4 festzustellen.

2.5.2.1. Reagenzien

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, 0,2 g Humanalbumin/
100 ml
- 2) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, 4 g Humanalbumin/
100 ml
- 3) 125 Jod-Gastrin (SHG I, ICI, Eigenmarkierung)
- 4) Gastrin-Antiserum 2604-(8)
- 5) Kaninchen-Gammaglobulin als "Ko-Präzipitat" (Fa.
Serva)
- 6) anti-rabbit precipitating serum, donkey (Fa. Wellcome)

2.5.2.2. Methode

Mit Hilfe eines Ph-Meters werden durch Titration mit 1 N Natronlauge bzw. 0,1 N Salzsäure die Wasserstoff-Ionen-Konzentrationen der beiden Puffer 1) und 2) auf verschiedene pH-Werte eingestellt:

pH 7,0 / pH 7,4 / pH 8,0 / pH 8,4 / pH 9,0.

Diese 5 verschiedenen Puffer dienen zum Verdünnen des Gastrin-Antiserums und des zweiten Antikörpers sowie als Standard-Leerwert (Mit 4 g Albumin/100 ml).

Dann werden B₀- und N-Werte pipettiert, die jeweils den einander entsprechenden pH-Wert aufweisen. Das weitere methodische Vorgehen ist in Kap. 2.6.0. beschrieben.

2.5.2.3. Ergebnis

In einem pH-Bereich von 7,0 bis 8,0 ist die erreichbare Bindung zwischen Gastrin und Gastrin-Antiserum höher als im Bereich von pH 8,4 bis pH 9,0 (Abb. 13). Eine spätere Wiederholung dieses Versuches zeigte die gleiche Beeinflussung der Reaktion durch verschiedene pH-Werte des Inkubationsmediums. Wir verwenden daher in unserem Radioimmunoassay ein Puffersystem mit dem pH-Wert von 7,4.

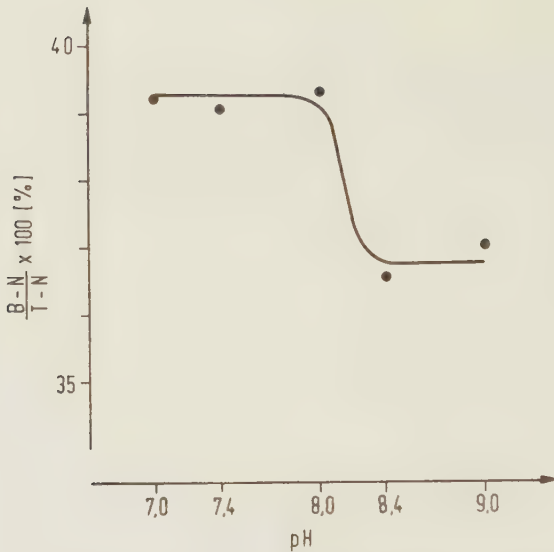


Abb. 13: Einfluß des pH im Inkubationsmedium auf die Bindungsrate $\frac{B-N}{T-N} \times 100 (\%)$.

2.5.3.0. Albumin-Gehalt

Der Proteingehalt im menschlichen Serum beträgt 6 g bis 8 g/100 ml. Davon hat die Albumin-Fraktion den Hauptanteil von ca. 4 g/100 ml. Der 0,02 M Na-Veronalpuffer, den wir in unserem Radioimmunoassay als Trägermedium einsetzen (sog. Puffer "A"), hat einen Albumingehalt von 0,2 g/100 ml. Wir untersuchten, ob sich durch Verwendung von Puffer mit einem höheren Albumingehalt Veränderungen in der Reaktion zwischen Gastrin und Gastrin-Antiserum ergeben.

2.5.3.1. Reagenzien

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, mit 0,2 g Humanalbumin (Behringwerke, Marburg/Lahn) pro 100 ml (puffer "A")
- 2) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, mit verschiedenen Konzentrationen von Humanalbumin/100 ml : 0,625 g, 1,0 g, 1,25 g, 2,0 g, 2,5 g, 4,0 g, 5,0 g.
- 3) 125 Jod Gastrin (SHG I, ICI, Eigenmarkierung)
- 4) Gastrin-Antiserum 2604-(B)
- 5) Kaninchen-Gammaglobulin (Fa. Serva)
- 6) anti-rabbit preprecipitating serum, donkey (Fa. Wellcome)

2.5.3.2. Methode

Verschiedene Standard-Leerwerte (B_0) und Werte für die unspezifische Bindung (N) werden pipettiert. Die einzelnen Proben enthalten dabei:

B_0 -Werte: 0,5 ml Puffer "A"

0,1 ml Gastrin-Antiserum

0,2 ml Puffer mit verschiedenen Albuminmengen

0,001 ml Gammaglobulin

0,1 ml 125 Jod-Gastrin

0,2 ml zweiten Antikörper (nach 24 Stunden)

N-Werte: 0,6 ml Puffer "A"

0,2 ml Puffer mit verschiedenen Albuminmengen

0,001 ml Gammaglobulin

0,1 ml 125 Jod-Gastrin

0,2 ml zweiten Antikörper (nach 24 Stunden)

Das weitere Vorgehen ist in Kap. 2.6. beschrieben.

2.5.3.3. Ergebnis

Der Versuch zeigte, daß der Gehalt an Humanalbumin des als Standard-Leerwert eingesetzten Puffers die Reaktion zwischen Gastrin und Gastrin-Antiserum beeinflusst.

Wenn man für die Standard-Verdünnungen, für Leerwerte und für benötigte Serum-Verdünnungen statt Puffer "A" mit 0,2 g Humanalbumin/100 ml Puffer mit höherem Albumingehalt (2,0 g bis 5,0 g/100 ml) verwendet, so nimmt die erreichbare Bindungsrate zu (Abb. 14).

Wir stellen deshalb für diese Zwecke eine größere Menge 0,02 M Na-veronalpuffer, pH 7,4, mit einem Gehalt an Humanalbumin von 4 g/100 ml her, die portioniert bei -20°C aufbewahrt wird.

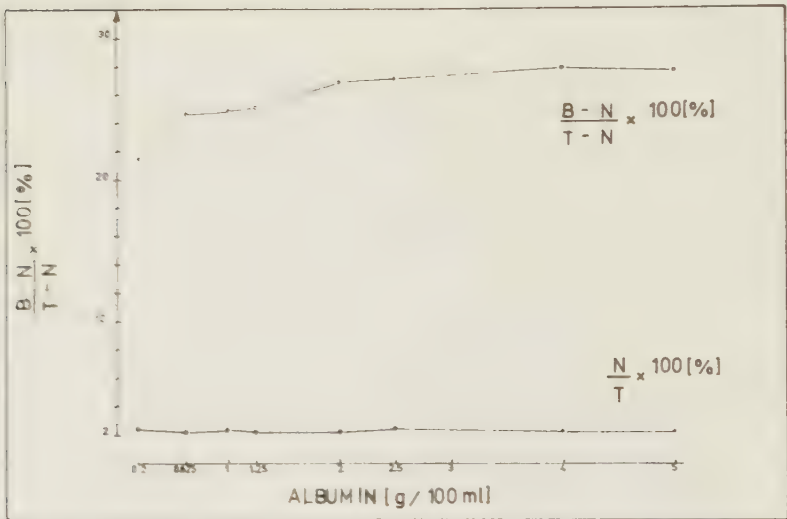


Abb. 14: Einfluß des Albumingehaltes im Inkubationsmedium auf die Bindungsrate $\frac{B-N}{T-N} \times 100 (\%)$.

2.5.4.0. Vorinkubation

Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Gastrin und Gastrin-Antiserum konkurrieren unmarkiertes Gastrin und ^{125}Jod -Gastrin um die Bindungsstellen des ersten Antikörpers. In der Regel erzielt man mit Hilfe einer Vorinkubation des unmarkierten Hormones mit dem Antiserum ohne gleichzeitige Zugabe der Tracer-Substanz eine Verbesserung des Radioimmunoassay (10, 11, 28, 61).

2.5.4.1. Reagenzien

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, 0,2 g Humanalbumin/
100 ml
- 2) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, 4 g Humanalbumin/
100 ml
- 3) Gastrin-Antiserum 2604-(8)
- 4) synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) als
Verdünnungsreihe
- 5) ^{125}Jod -Gastrin (SHG I, ICI, Eigenmarkierung)
- 6) Kaninchen-Gammaglobulin (Fa. Serva)
- 7) anti-rabbit precipitating serum, donkey (Fa. Wellcome)
Charge K 8135

2.5.4.2. Methode

An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden im Abstand von 24 Stunden jeweils eine Standard-Verdünnungskurve erstellt. Das methodische Vorgehen ist in Kap. 2.6. beschrieben. Die Proben wurden bei 4°C so lange inkubiert, bis nach dem Pipettieren der vierten Standardkurve zu allen fertiggestellten Proben gleichzeitig das ^{125}Jod -Gastrin dazugegeben wurde.

Es ergaben sich somit Vorinkubationszeiten von 72, 48, 24 und 0 Stunden.

Dann erfolgte die 24 Stunden dauernde Erstinkubation mit markiertem und unmarkiertem Gastrin bei 4°C. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers schloß sich die 16 Stunden dauernde Zweitinkubation bei 4°C an.

2.5.4.3. Ergebnis

Die Standardkurve verläuft mit zunehmender Vorinkubationszeit steiler. Den flachsten Verlauf weist die Kurve auf, bei der markiertes und unmarkiertes Gastrin gleichzeitig mit dem Gastrin-Antiserum in Verbindung kommen. Am steilsten verlaufen die Kurven, bei denen erst nach 48 bzw. 72 Stunden das ¹²⁵Jod-Gastrin dazugegeben wurde (Abb. 15).

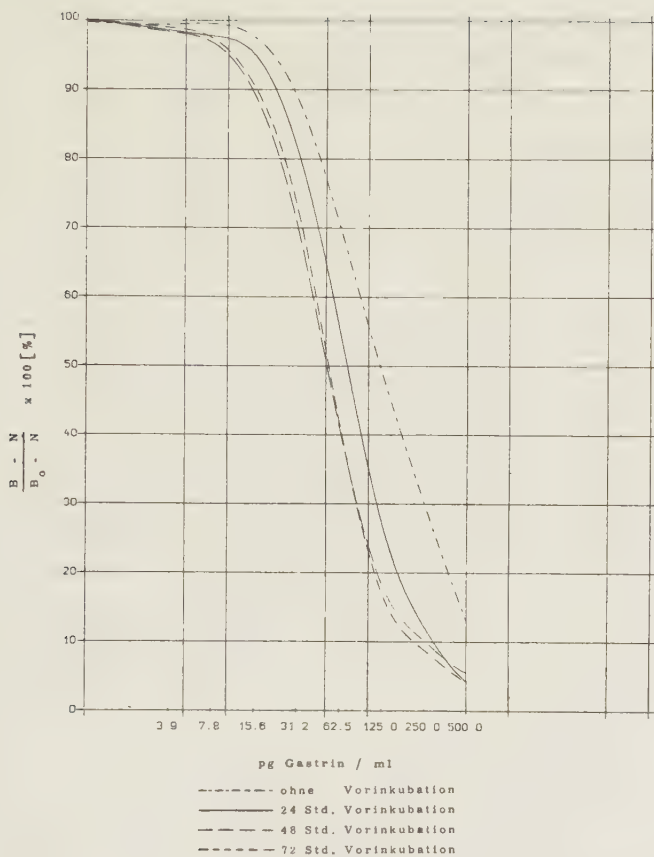


Abb. 15: 4 Standardkurven mit unterschiedlichen Vorinkubationszeiten

2.6.0.0. Durchführung der radioimmunologischen Gastrinbestimmung

2.6.1.0. Reagenzien

- 1) Humanalbumin, trocken, reinst, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 % (Fa. Behringwerke, Marburg/Lahn, Nr. ORHA)
- 2) Natriumacid (Reagenzien Merck, Nr. 6688)
- 3) Natriumchlorid (Reagenzien Merck, Nr. 6404)
- 4) Gammaglobulin aus Kaninchenserum, lyophilisiert, rein (Fa. Serva, Heidelberg, Nr. 22 540)
- 5) Antiserum 2604-(8) gegen Gastrin, vom Kaninchen
- 6) synthetisches (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) als Standard, Stammlösung 2 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$
- 7) ^{125}I -Jod-Gastrin (SHG I, ICI), Eigenmarkierung, Tracer der Fraktion III der Rechromatographie (vergl. Kap. 2.1.)
- 8) anti-rabbit precipitating serum, donkey (Fa. Wellcome)

2.6.2.0. Puffer und Lösungen

- 1) 0,02 M Na-Veronalpuffer, pH 7,4, mit 8 g NaCl pro Liter und 200 mg Natriumacid pro Liter
- 2) Puffer "A": 0,02 M Na-Veronalpuffer 1) mit 2 g Humanalbumin pro Liter (= 0,2 g/100 ml)
- 3) Puffer "B": 0,02 M Na-Veronalpuffer 1) mit 40 g Humanalbumin pro Liter (= 4 g/100 ml)
- 4) Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung mit 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, z.B. 350 mg Gammaglobulin gelöst in 50 ml Puffer "A"
- 5) Gastrin-Antiserum 2604-(8) 1 : 8 000 verdünnt in Puffer "A"
- 6) Standard-Verdünnungsreihe mit synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I, durch Verdünnung der Stammlösung mit

Puffer "B" auf die Werte 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8 / 3,9 pg/ml hergestellt

- 7) ¹²⁵Jod-Gastrin I (ICI) liegt mit 10 000 cpm verdünnt vor
- 8) zweiter Antikörper, nach Angabe des Herstellers je nach Charge mit unterschiedlichen Mengen Puffer "A" verdünnt.

2.6.3.0. Methode

2.6.3.1. Vorbereitungen für einen Ansatz

Zuerst wird das Protokoll für die Standardkurve und die zu bestimmenden Seren erstellt. Der Versuchsaufbau ist dabei auf die Auswertung mittels elektronischer Datenverarbeitung ausgerichtet (47). So ergibt sich die folgende Reihenfolge der Proben:

Zuerst neun Standard-Leerwerte (B_0), dann jeweils drei Werte der einzelnen Standardverdünnungen (beginnend bei 3,9 pg/ml), sechs Werte für die Bestimmung der unspezifischen Bindung (N-Werte), jeweils dreifach die ~~Referenzseren~~ mit normaler und mit hoher Gastrinkonzentration, jeweils dreifach die übrigen zu untersuchenden Seren.

Aus dem Protokoll, das die Unterlage für den Versuchsablauf bildet, gehen hervor: Die Anzahl der Proben, die dazu benötigten Mengen an Puffer, Gastrin-Antiserum, Kaninchen-Gammaglobulin, Tracer und zweitem Antikörper, sowie die Art und Anzahl der zu untersuchenden Proben.

2.6.3.2. Volumina

Es werden folgende Volumina (pro Probe) eingesetzt:

Serum-Proben: 0,5 ml Puffer "A"

0,2 ml Serum bzw. Standardlösung

	0,1 ml Gastrin-Antiserum
	0,001 ml Kaninchen-Gammaglobulin
B ₀ -Werte:	0,5 ml Puffer "A"
	0,2 ml Puffer "B"
	0,1 ml Gastrin-Antiserum
	0,001 ml Kaninchen-Gammaglobulin
N-Werte:	0,6 ml Puffer "A"
	0,2 ml Puffer "B"
	0,001 ml Kaninchen-Gammaglobulin

Diese Volumina werden mit dem halbautomatischen Pipettiergerät (Fa. Fisons) in die vorbereiteten Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert.

Dazu wird vorher gemäß den Protokoll-Angaben hergestellt: Lösung "A" aus Puffer "A" mit Gastrin-Antiserum und Kaninchen-Gammaglobulin im Mengenverhältnis 5 : 1 : 0,001 (für B₀- und Serumwerte), Lösung "B" aus Puffer "A" und Kaninchen-Gammaglobulin im Mengenverhältnis 6 : 0,001 (für N-Werte).

Als Beispiel:

Für 400 Proben (Serumwerte) benötigt man 200 ml Puffer "A", 40 ml Gastrin-Antiserum und 0,4 ml Kaninchen-Gammaglobulin. Für 50 N-Werte benötigt man 30 ml Puffer "A" und 0,05 ml Kaninchen-Gammaglobulin.

2.6.3.3. Pipettieren

Das Pipettiergerät wird mit Lösung "B" 15 bis 20 mal durchgespült; dann werden die sechs N-Werte wie im Protokoll angegeben pipettiert. Anschließend wird Lösung "B" durch Lösung "A" ersetzt und das Pipettiergerät erneut 15 bis 20 mal durchgespült. Nun werden der Reihe nach die Übrigen im Protokoll angegebenen Proben pipettiert. Beim Wechsel der Probe (z.B. beim Übergang zur nächsthöheren Standard-Konzentration) muß immer die Pipettenspitze sorgfältig abgewischt werden, um Verschleppungsfehler zu vermeiden. Wenn alle Proben fertig pipettiert sind, wird das Gerät mit

aqua bidest. nachgespült. Die Reaktionsgefäße in den Probenständern werden mit Plastik-Klarsichtfolie verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C für 24 Stunden inkubiert.

2.6.3.4. Zugabe des ^{125}Jod -Gastrin

Nach Ablauf der Vorinkubationszeit von 24 Stunden wird mit einer Dosierspritze (Fa. Hamilton) das rechtzeitig aufgetaute ^{125}Jod -Gastrin zu jeder Probe gegeben. Die Dosierspritze ist so geeicht, daß bei 20°C genau 0,1 ml Flüssigkeit pro Probe abgegeben wird. Anschließend werden die Proben wieder bei 4°C inkubiert.

2.6.3.5. Zugabe des zweiten Antikörpers

Nach Ablauf der sog. Erstinkubationszeit von 24 Stunden mit dem Tracer wird die Fällungsreaktion durch Zugabe des zweiten Antikörpers in Gang gebracht. Hierzu wird das mit Puffer "A" vorschriftsmäßig verdünnte präzipitierende Antiserum, welches ebenfalls eine Temperatur von 20°C haben muß, mit einer anderen Dosierspritze (Fa. Hamilton) zu jeder Probe gegeben (je 0,2 ml). Die Proben werden sofort wieder verschlossen und in den Kühlschrank gebracht.

Es folgt dann die zweite Inkubation bei 4°C für 16 Stunden. Das Schema für den gesamten Ablauf des Ansatzes ist in Abb. 16 dargestellt.

	1. AK + γ -Glob.	γ -Glob.	Puffer "B"	Standard	Serum	VORINKUBATION 24 Std. 4°C	125 _J Gastrin	ERSTINKUBATION 24 Std. 4°C	2. AK	ZWEITINKUBATION 16 Std. 4°C
B ₀	0,6 ml	-	0,2 ml	-	-		0,1 ml		0,2 ml	
N	-	0,6 ml	0,2 ml	-	-		0,1 ml		0,2 ml	
Standard	0,6 ml	-	-	0,2 ml	-		0,1 ml		0,2 ml	
Serum:- Probe	0,6 ml	-	-	-	0,2 ml		0,1 ml		0,2 ml	

Abb. 16: Pipettier- und Inkubationsschema für den
Gastrin-Radioimmunoassay

2.6.3.6. Trennen des Antikörper-gebundenen vom freien Gastrin

Nach Ablauf der Zweitinkubation werden die Proben 10 Minuten lang bei 3 000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand in jedem Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt (ein kleiner Flüssigkeitsspiegel über dem Präzipitat muß stehenbleiben). Die so vorbereiteten Gefäße mit dem Präzipitat kommen nun der Reihe nach in Plastik-Zählröhrchen.

2.6.3.7. Messen der Radioaktivität

Im Anschluß an die Trennung des freien und gebundenen Gastrin werden die Zählröhrchen mit den Proben fortlaufend

in das Gamma-Zählgerät (Gamma-Guard 150, Fa. Tracerlab) gestellt und die enthaltenen Impulse jeder Probe 2 Minuten lang gemessen. Das Zählgerät ist mit einem automatischen Probenwechsler ausgestattet und mit einem Lochstreifen-Plotter verbunden, der die gezählten radioaktiven Impulse zusammen mit der Proben-Nummer und der Zählzeit auf einen Lochstreifen überträgt. Durch die gewählte Zählzeit von 2 Minuten wird das Ausmaß des "statistischen Zählfehlers" kleingehalten. Dieser Zählfehler ist abhängig von der Zählrate pro Zeiteinheit. Wir wählten deshalb eine Zählrate von über 20 000 counts/2 min für die Gesamtaktivität.

2.6.3.8. Auswertung

Nach Abschluß des Zählvorganges werden die auf dem Lochstreifen gespeicherten Daten mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitungsanlage der Medizinischen Universitätsklinik Innenstadt (Laboratorien für klin. Chemie und Endokrinologie, Leiter Prof. Dr.med. P.C.Scriba) ausgewertet. Dazu steht eine 48-kb-Anlage vom Typ Siemens 404/3 mit Wechselplattenspeicher, Lochstreifen-Peripherie und Plotter zur Verfügung *.

Das zur Berechnung radioimmunologischer Meßdaten verwendete Verfahren ist die "spline-approximation" (47). Diese mathematische Methode erlaubt das Erstellen von stetigen, optimal geglätteten Kurven aus den einzelnen Punkten einer Standard- oder Serum-Verdünnungsreihe.

* Wir danken Herrn Dr.med. I.Marschner und seinen Mitarbeitern für die Auswertung zahlreicher Versuche.

2.7.0.0. Angaben zur Präzision

2.7.1.0. Intra-Assay-Variation

Um Angaben zur Präzision unserer radioimmunologischen Gastrinbestimmungsmethode machen zu können, untersuchten wir das Verhalten von Serumproben mit niedrigem und mit hohem Gastrinspiegel. Innerhalb eines Ansatzes wurden je 30 Proben eines Referenzserums mit normalem (Nüchtern-) Gastrinspiegel und mit hohem (postprandialen) Gastrinspiegel hintereinander pipettiert und anschließend der jeweilige Mittelwert und der Variationskoeffizient der erhaltenen Gastrinkonzentrationen bestimmt (Tab. 6).

Tab. 6: Intra-Assay-Variation: Bestimmung von je 30 Proben zweier Referenzseren mit normalem und hohem Gastringehalt in einem Ansatz

a)normaler Gastrinspiegel(pg/ml) b)hoher Gastrinspiegel(pg/ml)

38,81	41,57	247,96	284,68
38,81	36,69	246,58	218,35
39,26	37,73	269,82	230,58
36,04	39,24	263,18	244,30
35,31	40,46	297,48	252,21
36,19	34,98	266,86	229,57
32,43	36,17	242,06	266,33
37,81	34,63	258,59	256,59
35,22	37,21	257,83	245,20
37,75	39,20	264,22	250,30
38,45	39,32	265,80	263,44
37,32	38,99	248,89	224,91
36,86	35,25	269,09	229,37
37,44	37,29	257,33	263,80
37,94	38,54	274,80	263,70

Anzahl der Serumproben mit normaler Gastrinkonzentration
 $n = 30$.

Mittelwert: 37,43 pg/ml, S.E.M.: 1,93,

Variationskoeffizient: 5,15.

Anzahl der Serumproben mit hoher Gastrinkonzentration
 $n = 30$.

Mittelwert: 254,09 pg/ml, S.E.M.: 17,48,

Variationskoeffizient: 6,89.

Somit wurde für die Intra-Assay-Variation ein Variationskoeffizient von 5,2 für den Normalbereich und von 6,9 für den hohen Bereich ermittelt.

2.7.2.0. Inter-Assay-Variation

Zum Qualitätsvergleich der Ansätze untereinander und zur Feststellung der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse untersuchten wir in gleicher Weise das bereits beschriebene Referenzserum mit normalem Gastrinspiegel ($37,4 \pm 1,9$ pg/ml) und das hypergastrinämische Referenzserum ($254,1 \pm 17,5$ pg/ml) in 46 aufeinanderfolgenden Ansätzen. Der jeweilige Mittelwert und der Variationskoeffizient wurden bestimmt (Tab. 7 und Tab. 8).

Tab. 7: Inter-Assay-Variation: Bestimmung des Referenzserums mit normalem Gastrinspiegel (pg/ml) in 46 aufeinanderfolgenden Ansätzen.

36,21	31,99	35,33	39,31	38,95	34,77
35,52	36,50	37,85	37,95	35,03	39,49
35,85	32,86	39,88	42,14	39,03	29,10
43,15	42,80	36,79	33,11	32,14	31,96
36,86	40,32	37,82	43,27	43,45	39,15
34,33	41,68	37,81	37,99	28,94	39,32
31,94	40,44	37,15	34,02	34,44	35,51
44,72	34,61	36,22	35,07		

Anzahl der Serumproben mit normaler Gastrinkonzentration
n = 46.

Mittelwert: 37,02 pg/ml, S.E.M.: 3,76,

Variationskoeffizient: 10,55.

Tab. 8: Inter-Assay-Variation: Bestimmung des Referenzserums mit hohem Gastrinspiegel (pg/ml) in 46 aufeinanderfolgenden Ansätzen.

240,34	207,91	245,53	252,67	238,52	222,45
239,22	234,06	196,15	232,27	256,51	248,21
184,85	192,60	229,79	192,28	221,37	213,19
213,33	195,87	254,57	262,54	238,07	195,11
258,36	236,13	191,80	190,28	248,71	187,01
212,86	250,76	238,58	227,99	194,20	250,30
233,26	199,17	238,14	243,43	237,77	220,42
213,48	202,34	230,82	212,20		

Anzahl der Serumproben mit hoher Gastrinkonzentration
 $n = 46$.

Mittelwert: 224,29 pg/ml, S.E.M. 22,26,

Variationskoeffizient: 9,92.

Somit wurde für die Inter-Assay-Variation ein Variationskoeffizient von 10,6 für den Normalbereich und von 9,9 für den hohen Bereich ermittelt.

2.7.3.0. Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze ist durch die elektronische Auswertung mittels spline approximation definiert als dreifache Standardabweichung des Leerwertes B_0 (47).

Bei unserem Radioimmunoassay lag sie im Mittel bei 2 pg/ml.

2.7.4.0. Regressionskoeffizient

Der Regressionskoeffizient gibt die Übereinstimmung zwischen Standardkurve und Wiederfindekurve an. Die Wiederfindekurve wird durch Zugabe von synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) zu einem durch Aktivkohle-Adsorption Gastrin-frei gemachten menschlichen Serum gewonnen. Die Übereinstimmung der tatsächlich mit Hilfe der Standardkurve gemessenen Gastrinkonzentrationen in diesem Serum mit den erwarteten Werten wird durch den Regressionskoeffizienten ausgedrückt. Dieser beträgt in unserem Radioimmunoassay 0,955 für den Standardkurven-Bereich von 10 pg/ml bis 250 pg/ml. Das bedeutet eine fast völlige Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den erwarteten Werten.

3.0.0.0. BEISPIELE FÜR DIE PRAKTISCHE ANWENDUNG DER BESTIMMUNGSMETHODE IN EXPERIMENT UND KLINIK

3.1.0.0. Normal-Kollektiv

3.1.1.0. Einführung

Zur vergleichenden Messung des Serum-Gastrinspiegels bei verschiedenen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes ist es nötig, einen Bezugspunkt zu kennen, welcher die Einteilung der ermittelten Werte in normale und pathologische Bereiche ermöglicht. Um einen solchen Bezugspunkt zu ermitteln, untersuchten wir 90 gesunde Personen, die zusammengefaßt das "Normal-Kollektiv" darstellen.

3.1.2.0. Material und Methodik

Wir untersuchten 90 Personen im Alter von 10 bis 76 Jahren (71 Männer, 19 Frauen). Ein Teil nahm auf freiwilliger Basis, ein Teil als Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Innenstadt im Rahmen der routinemäßigen Laboruntersuchungen an dem Versuch teil.

Die Versuchspersonen mußten zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch gesund sein. Sie durften insbesondere weder anamnestisch noch klinisch einen Hinweis auf gastrointestinale Erkrankungen bieten. Probanden mit einem Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni wurden bereits beim Verdacht auf ein solches Leiden vom Versuch ausgeschlossen wie Personen mit vorangegangenen abdominalen Operationen.

Nach mindestens 12-stündiger Nahrungs-, Alkohol- und Nikotinkarenz wurde den Probanden morgens durch Punktion einer Cubitalvene etwa 20 ml Blut entnommen. Dieses Blut wurde bis zur Serumgewinnung im Eisbad bei 0°C aufbewahrt. Das durch Zentrifugieren (15 Minuten bei 5 000 U/min) und Ab-

pipettieren gewonnene Serum bewahrten wir bis zur radioimmunologischen Gastrinbestimmung bei -20°C tiefgefroren auf. Alle 90 Serumproben wurden nach der im Kap. 2.6. beschriebenen Methode jeweils dreifach in einem Ansatz bestimmt.

3.1.3.0. Ergebnis

Die gemessenen Werte (Tab. 9) verteilen sich logarithmisch über einen Bereich von 13,9 pg/ml bis 125,3 pg/ml. Der Mittelwert ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$) liegt bei $41,5 \pm 2,2$ pg/ml. Die Standardabweichung beträgt 21,2 pg/ml bei einem Variationskoeffizienten von 51,1.

Tab. 9: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen des basalen Serumgastrins (pg/ml) von Normalpersonen (n = 90).

35,15	22,96	45,70	68,99	33,08	28,40
48,85	51,31	36,46	48,62	64,38	37,17
77,96	33,09	44,16	27,43	39,64	26,80
25,20	125,25	29,30	34,51	42,84	43,06
41,92	31,06	28,38	44,70	33,39	47,71
16,36	42,54	46,64	52,42	68,36	21,23
100,47	37,16	13,89	29,50	82,28	61,23
29,24	70,51	32,87	117,37	32,85	22,67
27,86	23,06	52,55	73,62	46,82	31,64
89,51	20,99	57,13	29,21	58,61	29,05
28,08	72,70	27,43	27,22	41,95	26,61
32,62	57,01	43,95	31,00	22,24	27,26
41,48	75,66	16,73	33,59	25,69	32,76
26,12	35,11	25,79	30,55	23,00	19,13
21,38	33,53	41,14	44,90	30,22	29,15

Der 1-s-Bereich erstreckt sich von 24,1 pg/ml bis 58,3 pg/ml. Der 2-s-Bereich erstreckt sich von 12,0 pg/ml bis 116,5 pg/ml. Er enthält alle gemessenen Werte bis auf einen einzigen. Der 3-s-Bereich erstreckt sich von 8,0 pg/ml bis 174,8 pg/ml.

Nach Logarithmieren ergibt sich folgende Verteilung der Werte:

Medianwert: 37,5 pg/ml

Streuungsfaktor: 1,555

Daraus ergibt sich der sog. 90 %-Normalbereich (entsprechend dem 1-s-Bereich der Normal-Verteilung) der logarithmischen Verteilung nach der Formel:

Untere Grenze = Median: Streufaktor = 24,1 pg/ml,

Obere Grenze = Median x Streufaktor = 58,3 pg/ml.

Die Altersverteilung unseres Normal-Kollektivs war folgende:

10 - 29 Jahre	41 Personen (31 Männer, 10 Frauen),
30 - 49 Jahre	32 Personen (24 Männer, 8 Frauen),
50 - 69 Jahre	9 Personen (8 Männer, 1 Frau),
70 und mehr Jahre	8 Personen (8 Männer).

Der Mittelwert der Altersverteilung liegt bei 34,98 $\pm$ 1,59 Jahren.

Es waren weder geschlechts- noch altersspezifische Unterschiede des Serum-Gastrinspiegels bei den untersuchten 90 Personen zu erkennen (Abb. 17).

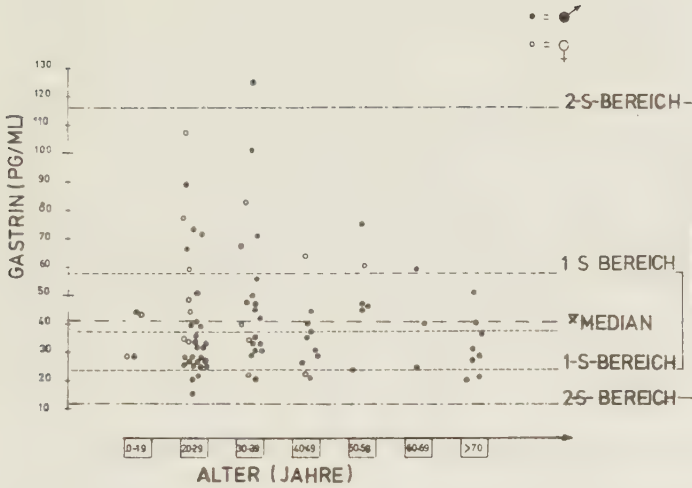


Abb. 17: Mittelwert ($\bar{x}$), Median, 1-s- und 2-s-Bereich von Serumgastrin (pg/ml), sowie Alters- und Geschlechtsverteilung des Normalkollektivs (n = 90).

3.2.0.0. Untersuchungen mit Ratten-Serumgastrin

3.2.1.0. Rattenserum-Verdünnungskurve

Da sich menschliches Gastrin und Gastrin anderer Spezies strukturell unterscheiden (Abb. 1), sollte untersucht werden, ob sich Rattengastrin radioimmunologisch identisch verhält wie das als Standard-Präparat verwendete synthetische (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH).

Rehfeld et al. (58) beschreiben bei Untersuchungen mit dem Gastrin-Antiserum 2604 die Möglichkeit, auch Gastrin von Hund und Schwein nachzuweisen. Ob dies auch für Serumgastrin der Ratte zutrifft, war nicht bekannt und sollte untersucht werden.

3.2.1.1. Material und Methodik

Untersucht wurden mehrere Wistar-Albinoratten aus eigener Klinikzüchtung. Nach einer mehrstündigen Fastenperiode bekamen die Tiere große Mengen Ratten-Vollnahrung angeboten. Unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme wurde in Äthernarkose mittels Herzpunktion Blut entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in Eiswasser bei 0°C aufbewahrt. Das durch Zentrifugieren gewonnene Serum wurde bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

In einem Ansatz wurden einige Serumproben unverdünnt und in den Verdünnungsstufen 1 : 2 und 1 : 5 (jeweils mit Puffer "A" verdünnt) getestet. Wir wollten sehen, ob Gastrin in entsprechend hohen Konzentrationen nachweisbar vorhanden war.

Nachdem diese Voruntersuchung positiv verlaufen war, und wir Gastrinspiegel von 100 pg/ml bis 125 pg/ml nachweisen konnten, fertigten wir vom Serum mit der höchsten Gastrin-

konzentration eine Verdünnungsreihe an. Folgende 8 Werte wurden durch Verdünnung mit Puffer "A" hergestellt:

125 / 109 / 93,7 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8 / 3,9 pg/ml.

Die Gastrinbestimmung erfolgte in einem Ansatz, wie in Kap. 2.6. beschrieben.

3.2.1.2. Ergebnis

Die Rattenserum-Verdünnungskurve zeigte den gleichen Verlauf wie die Standardkurve mit synthetischem (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH)(Abb. 18).

Rattenserumgastrin verhält sich somit radioimmunologisch gleich wie unser Standardgastrin, dessen immuno-identisches Verhalten mit endogenem menschlichen Gastrin bereits gezeigt werden konnte (vergl. Abb. 8).

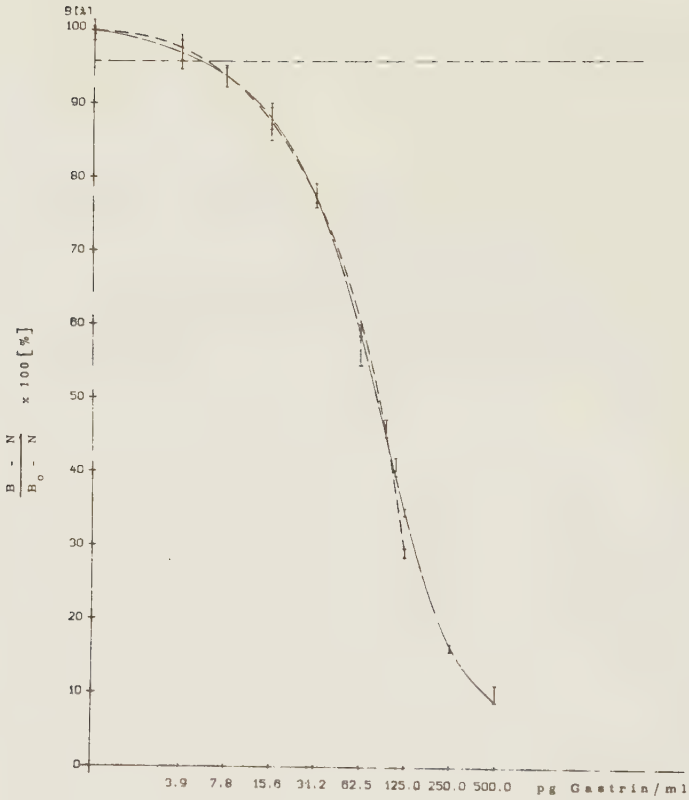


Abb. 18: Vergleich einer Standardkurve mit SHG I (WÜNSCH) (—) und einer Rattenserum-Verdünnungskurve (----).

3.2.2.0. Ratten-Normalkollektiv

Nachdem wir zeigen konnten, daß mit dem von uns verwendeten Gastrin-Antiserum 2604-(8) auch Rattenserumgastrin nachgewiesen werden kann, wollten wir als weitere Basisuntersuchung für spätere Forschungsvorhaben den mittleren basalen Serumgastrinspiegel der Wistar-Albinoratte bestimmen.

3.2.2.1. Material und Methodik

20 gesunden Wistar-Albinoratten wurde nach 12-stündiger völliger Nahrungskarenz mittels Herzpunktion in Äthernarkose Blut entnommen. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Blut in Eiswasser bei 0°C aufbewahrt. Das durch Zentrifugieren gewonnene Serum wurde bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

In einem Ansatz bestimmten wir anschließend jeweils dreifach die Nüchtern-Gastrinspiegel der untersuchten 20 Ratten. Die Methode ist im Kap. 2.6. beschrieben.

3.2.2.2. Ergebnis

Tab. 10: Normalwerte für Serumgastrin (pg/ml) der Wistar-Albinoratte (n = 20):

37,6	47,0	31,3
35,1	78,8	45,8
48,4	32,3	35,1
27,4	35,3	41,8
30,2	40,5	37,7
43,3	38,0	55,8
28,0	45,6	

Mittelwert des Normalbereiches: 40,7 pg/ml,

Standardabweichung: 11,6

Variationskoeffizient: 28,5

S.E.M.: 2,6

Nach Elimination des hohen Wertes von 78,8 pg/ml ergibt sich folgende Verteilung (n = 19):

Mittelwert des Normalbereiches: 38.7 pg/ml,

Standardabweichung: 7,6,

Variationskoeffizient: 19,6

S.E.M.: 1,7

Der 2-s-Bereich erstreckt sich von 17,5 pg/ml bis 64,0 pg/ml.

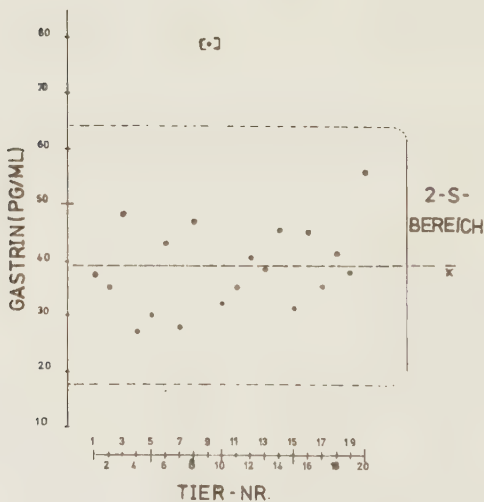


Abb. 19: Nüchterngastrin (pg/ml) von Wistar-Albinoratten (n = 19).

Mittelwert ($\bar{x}$) des Normalbereiches und 2-s-Bereich.

3.3.0.0. Verhalten von Serumgastrin nach intraduodenaler Gabe von Galle, Calciumchlorid und Natriumchlorid

3.3.1.0. Intraduodenale Gabe von Galle

3.3.1.1. Einführung

Wie FORELL et al. (16) zeigen konnten, führt die intraduodenale Gabe von Galle zu einer Stimulation des exokrinen Pankreas, wobei besonders die Sekretion von Trypsin, Amylase und Lipase gesteigert ist. Exogene Zufuhr von Gastrin bewirkt in Dosen von 1 bis 4 $\mu\text{g/kg KG}$ und Stunde eine Steigerung der exokrinen Pankreassekretion. Dabei wird vor allem die Enzymsekretion, in geringerem Ausmaß die Wasser- und Elektrolytsekretion stimuliert (65). Ob zwischen diesen beiden Mechanismen der Pankreasstimulation Zusammenhänge bestehen, ist noch nicht ausreichend geklärt (39).

Da das Serumgastrin zum Teil aus G-Zellen des Duodenum stammt (24, 37, 46) und über die Stimulierbarkeit dieses sog. extragastrischen Gastrins durch Gabe einer Testmahlzeit berichtet wird (5, 37), untersuchten wir die Frage, ob die intraduodenale Gabe von Galle zu einer Freisetzung von duodenalem Gastrin führen kann und über diesen Mechanismus die Stimulation der exokrinen Pankreassekretion bewirkt wird.

3.3.1.2. Probanden und Methodik

15 Personen (7 Männer, 8 Frauen) im Alter von 18 bis 65 Jahren (Durchschnittsalter 40,7 Jahre), welche gastrointestinal- und stoffwechselgesund waren, bekamen morgens nach 15-stündigem Fasten unter röntgenologischer Kontrolle eine

doppelläufige Dreiling-Sonde in das Duodenum gelegt. Gleichzeitig wurde eine Cubitalvene punktiert und eine Infusion mit physiologischer Kochsalz-Lösung angelegt, um für die Versuchsdauer von über 2 Stunden die Blutentnahmen zur Serumgewinnung und die parenterale Zufuhr von Sekretin und Cholecystokinin zu ermöglichen. Zu Beginn des Versuches wurde über die Duodenalsonde 6 g in 20 ml Wasser gelöste standardisierte Rindergalle (Fa. Kali-Chemie, Pharma GmbH, Hannover) in das Duodenum instilliert. In den folgenden 60 Minuten wurde in drei 20-Minuten-Fractionen der Duodenalsaft gesammelt und die Pankreassekretion mittels der Volumen-, Bicarbonat-, Amylase-, Lipase- und Trypsinbestimmung gemessen (52). Außerdem wurde zum Zeitpunkt 2 Minuten vor und 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach intraduodenaler Galleinstillation Venenblut entnommen und das daraus gewonnene Serum bis zur radioimmunologischen Gastrinbestimmung bei -20°C eingefroren.

Während weiterer 60 Minuten des Versuches wurde durch intravenöse Bolusinjektion von 1 CHR-Einheit Secretin und 1 ID-Einheit Cholecystokinin (jeweils pro kg Körpergewicht) eine hormonelle Pankreasstimulation durchgeführt, ohne daß Serumproben für die Gastrinmessung gewonnen wurden.

3.3.1.3. Ergebnis

Die nach intraduodenaler Galleinstillation und nach parenteraler hormoneller Stimulation aus dem abgesaugten Duodenalsekret gemessenen Parameter der exokrinen Pankreassekretion (Volumen, Bicarbonat, Amylase, Lipase und Trypsin) lagen in dem von OTTE et al. (52) angegebenen 2-s-Normalbereich (39). Auf ihre genaue Darstellung wird im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Das Serumgastrin zeigte vor und bis 60 Minuten nach Galle-

instillation folgendes Verhalten (Abb. 20 und Tab. 11): Von einem mittleren Basalspiegel von 65 pg/ml stieg die Serumgastrin-Konzentration innerhalb von 5 Minuten nach intraduodenaler Galleinstillation auf 77 pg/ml an, um anschließend kontinuierlich abzufallen auf 70 pg/ml (zum Zeitpunkt 60 Minuten). Während der ersten 5 Minuten gemessene Galle-induzierte Gastrinanstieg ist nach dem Student-t-Test für den Vergleich gepaarter Stichproben statistisch signifikant ($p < 0,025$).

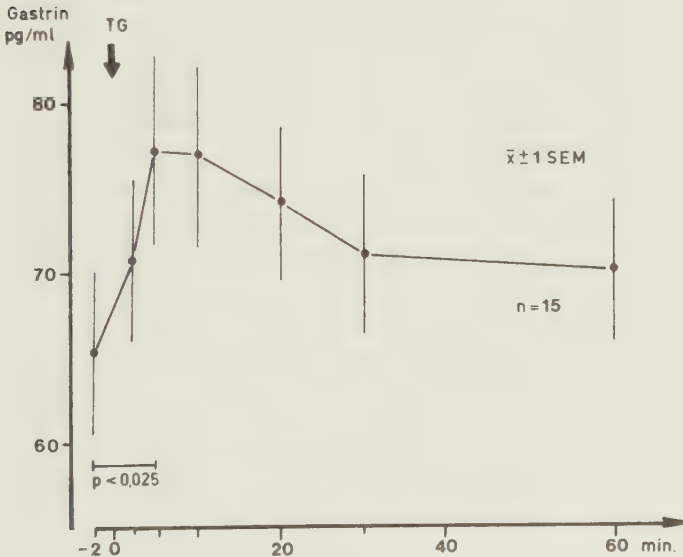


Abb. 20: Verhalten von Serumgastrin (pg/ml) beim Menschen vor und nach intraduodenaler Gabe von 6 g Rindergalle (TG).

Tab. 11: Serumgastrin (pg/ml) beim Menschen (n = 15)
vor und nach intraduodenaler Gabe von 6 g
Rindergalle.

Proband Nr.	Zeit in Minuten						
	-2	2	5	10	20	30	60
3694	65,4	66,0	82,2	80,8	62,0	70,6	65,2
3823	48,5	46,6	45,3	49,6	46,6	51,7	57,0
3693	76,8	89,8	123,6	111,3	100,4	87,3	89,8
3747	113,7	107,5	104,7	105,9	108,0	112,2	110,4
3754	48,3	67,0	74,9	72,1	76,4	73,8	68,2
3579	54,5	70,9	74,5	93,9	89,5	94,1	79,3
3746	53,2	40,2	55,2	50,3	51,0	47,4	52,1
3525	57,4	57,6	56,1	58,2	65,3	62,6	56,7
3734	67,0	64,3	67,8	65,6	66,7	65,8	62,3
3732	67,7	68,2	75,6	77,0	83,9	66,5	70,8
3691	56,2	57,4	60,2	55,3	58,7	51,8	49,8
3685	43,0	95,6	105,3	92,5	81,7	73,3	73,5
3499	64,3	68,5	63,9	68,3	65,8	67,2	66,7
3504	74,2	75,0	73,5	75,9	61,8	67,2	75,3
3582	88,7	86,2	94,6	106,8	93,7	69,6	76,0
$\bar{x}$ =	65,2	70,7	77,2	76,9	74,1	71,0	70,2
SD =	18,1	18,0	21,6	20,2	18,2	17,4	15,5
SEM =	4,7	4,6	5,6	5,2	4,7	4,7	4,0

3.3.2.0. Intraduodenale Gabe von Calciumchlorid

Zur weiteren Abklärung der in Kap. 3.3.1. beschriebenen Stimulierbarkeit von Gastrin durch intraduodenale Gabe von Galle wurde untersucht, ob durch intraduodenale Instilla-

tion einer dem verwendeten Gallepräparat äquivalenten Calcium-Konzentration eine Veränderung der Gastrinkonzentration im Serum nachweisbar ist. Zusätzlich wurde eine um das 10-fach höhere Calcium-Konzentration getestet. Für diese Vorversuche wurde Calcium deshalb gewählt, weil es in einer Konzentration von 13,5 mVal/l in der verwendeten Gallepräparation gefunden wurde (40). Außerdem haben HOLTERMÜLLER et al. (30) nachgewiesen, daß mit Hilfe einer duodenalen Calciumperfusion eine Stimulation des exokrinen Pankreas beim Menschen möglich ist.

3.3.2.1. Probanden und Methodik

Nach 15-stündigem Fasten wurde den 8 Probanden morgens unter röntgenologischer Kontrolle eine Duodenalsonde gelegt. Gleichzeitig wurde eine Cubitalvene punktiert und eine Infusion mit physiologischer Kochsalzlösung angelegt, um Blutentnahmen zur Serumgewinnung zu ermöglichen. Die Blutentnahmen erfolgten 2 Minuten vor sowie 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach intraduodenaler Calciumchlorid-Gabe. 4 Probanden erhielten dabei die in der Galle enthaltene Calcium-Konzentration von 13,5 mVal/l als CaCl_2 , gelöst in 20 ml Wasser, pH 7,2. Eine zweite Gruppe von 4 Probanden erhielt die 10-fache Konzentration, nämlich 135 mVal/l, ebenfalls in 20 ml Wasser, pH 7,2.

Bei diesen Voruntersuchungen wurden nur Gastrinbestimmungen im Serum, jedoch keine Pankreasfunktionsprüfungen vorgenommen.

3.3.2.2. Ergebnis

Wie die Abb. 21 und Tab. 12 zeigen, war weder nach 13,5 noch nach 135 mVal/l Calciumchlorid ein Gastrinanstieg zu messen.

Tab. 12: Serumgastrin vor und nach intraduodenaler Gabe von 20 ml einer 13,5 mVal/l (4 Probanden des oberen Tabellen-Anteiles: "Wo" bis "Hu") und einer 135 mVal/l enthaltenen CaCl_2 -Lösung (4 Probanden des unteren Tabellen-Anteiles: "Schl" bis "Re").

Pat.	Zeit in Minuten						
	-2	+2	5	10	220	30	60
Wo.	45	53	48	48	52	35	44
Schm.	32	35	33	38	38	32	33
Bl.	49	43	36	38	51	37	41
Hu.	97	102	93	90	73	-	82
Schl.	30	31	32	43	25	34	32
Ma.	33	-	39	35	30	29	25
Ku.	101	96	93	83	81	70	70
Re.	40	-	41	47	42	50	41

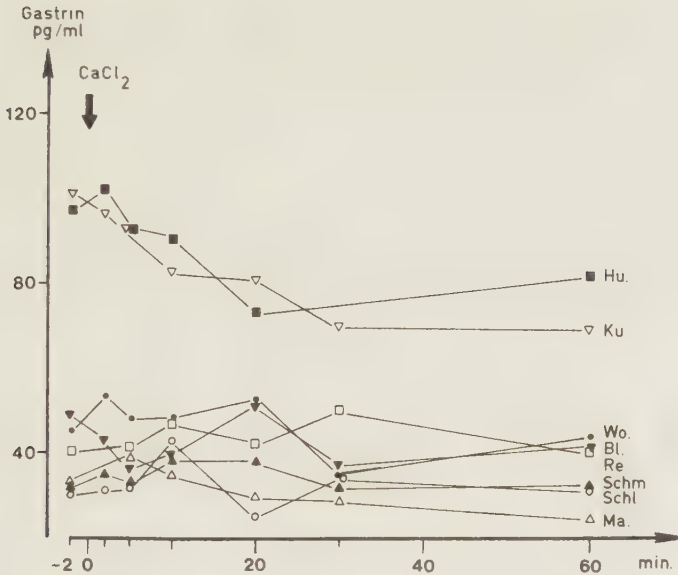


Abb. 21: Verhalten von Serumgastrin vor und nach intraduodenaler Gabe von 13,5 mVal/l (ausgefüllte Symbole) und 135 mVal/l (leere Symbole) Calciumchlorid (CaCl_2).

3.3.3.0. Intraduodenale Gabe von Natriumchlorid

3.3.3.1. Einführung

Um ausschließen zu können, daß es sich bei dem Gastrin-stimulierenden Mechanismus nach intraduodenaler Verabreichung von Galle um einen reinen Volumeneffekt handelt,

untersuchten wir bei einer Kontrollgruppe von 5 Probanden das Verhalten des Serumgastrins nach intraduodenaler Gabe von 20 ml einer physiologischen Kochsalzlösung, pH 7,2. Bei 5 stoffwechsel- und gastrointestinal gesunden Versuchspersonen wurde im Einzelnen wie bei den vorhergehenden Versuchen verfahren (s. Kap. 3.3.2.1.).

3.3.3.2. Ergebnis

Die Abb. 22 und die Tab. 13 machen deutlich, daß nach intraduodenaler Gabe einer 0,9 %igen Kochsalz-Lösung keine Serumgastrinfreisetzung festzustellen war.

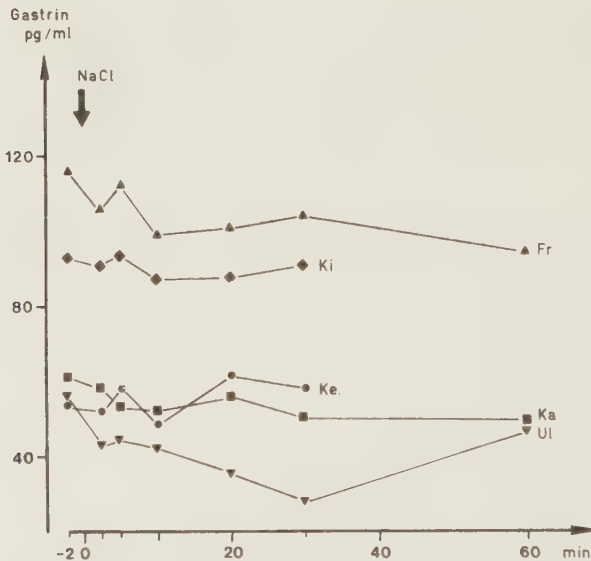


Abb. 22: Verhalten von Serumgastrin vor und nach intraduodenaler Gabe von physiologischer Kochsalz-Lösung (NaCl).

Tab.: 13: Serumgastrin vor und nach intraduodenaler
Gabe von 20 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung.

Pat.	Zeit in Minuten						
	-2	+2	5	10	20	30	60
Ka.	61	58	53	52	56	50	49
Fr.	117	107	113	99	101	104	94
Ul.	55	42	44	41	35	27	46
Ke.	54	52	58	47	61	57	-
Ki.	93	91	93	87	87	91	-
$\bar{x}$ =	72,0	70,0	72,2	65,2	68,0	65,8	63,0
SD =	32,9	27,7	29,4	26,0	26,1	31,3	26,9
SEM =	14,7	12,4	13,2	11,6	11,7	14,0	15,5

3.3.4.0. Verhalten von Serumgastrin während Secretin- infusion und gleichzeitiger intraduodenaler Gabe von Calcium- bzw. Natriumchlorid.

3.3.4.1. Einführung

In Ergänzung zu den unter Kap. 3.3.2. und 3.3.3. beschriebenen Versuchen wurde zusätzlich getestet, ob die in dem verwendeten standardisierten Gallepräparat enthaltene Calcium-Konzentration von 13,5 mVal/l als Mediator der stimulierenden Wirkung auf den Gastrinspiegel und auf die exokrine Pankreassekretion in Frage kommt.

3.3.4.2. Material und Methodik

Während einer modifizierten Pankreasfunktionsprüfung bekamen 5 gastrointestinal- und stoffwechselgesunde Versuchspersonen über einen Perfusor eine intravenöse Infusion von 0,5 klin. Einheiten Secretin * (pro kg. Körpergewicht und Stunde) für die Dauer von 140 Minuten. 60 und 100 Minuten nach Beginn der Secretininfusion wurde ihnen über eine doppelläufige Duodenalsonde 20 ml Calciumchloridlösung (13,5 mVal/l, pH = 7,2) bzw. 20 ml physiologische Kochsalz-Lösung in das Duodenum instilliert. Nach 140 Minuten wurde die Secretininfusion gestoppt und sofort anschließend eine intravenöse Bolusinjektion von 1 klin. Einheit Secretin** und 1 ID-Einheit Cholecystokinin** (pro kg. Körpergewicht) vorgenommen. Während der gesamten Versuchsdauer von 180 Minuten wurde Duodenalsaft zur exkretorischen Pankreasfunktionsprüfung (52) in 10 - Minuten - Fraktionen abgesaugt. Venenblut für die Gastrinbestimmung wurde jeweils 2 Minuten vor und zu definierten Zeiten während der gesamten Versuchsdauer (s. Abb. 23 und Tab. 14) entnommen.

3.3.4.3. Ergebnis

Nach Beginn der Secretin-Infusion kam es zu einem deutlichen Abfall des Gastrinspiegels von im Mittel 65 auf 53 pg/ml (-2 bis 20 Minuten), der sich bei laufender Secretininfusion nach intraduodenaler Gabe von Calcium- und Natriumchlorid nicht veränderte (Abb. 23 und Tab. 14). Nach intravenöser

* Fa. Boots, Nottinham, England

** GIH-Research Unit, Karolinska-Institut, Stockholm

Bolusinjektion von Secretin und Cholecystokinin nahm die Serumgastrinkonzentration erneut von im Mittel 48 auf 38 pg/ml ab.

Die Bilirubinausscheidung ins Duodenum wurde durch Calciumchlorid und Natriumchlorid nicht beeinflußt, eine Sekretionssteigerung des exokrinen Pankreas (hier gezeigt am Beispiel Trypsin und Volumen) war ebenfalls nicht zu beobachten (Abb. 23). Erst nach der Secretin/Cholecystokininjektion kam es zu einer deutlichen Bilirubinausscheidung und zu einer vermehrten Trypsin- und Volumensekretion.

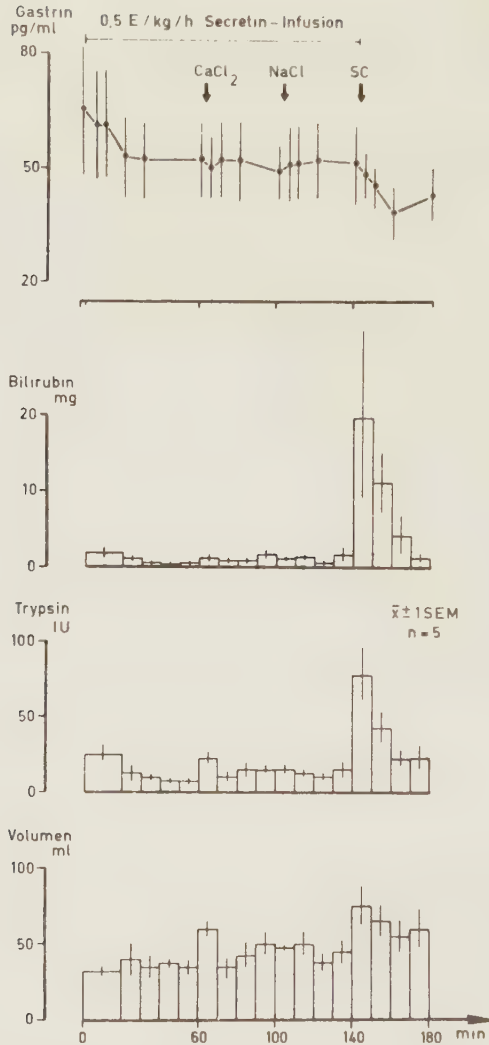


Abb. 23: Verhalten von Serumgastrin, Bilirubin, Trypsin- und Volumensekretion bei Kontrollpersonen ($n = 5$) nach intraduodenaler Instillation von Calcium- und Natriumchlorid während Secretininfusion und nach intravenöser Gabe von Secretin/Cholecystokinin (SC).

Tab. 14: Serumgastrin (pg/ml) während Secretin-Infusion
(0,5 E/kg/h)

Proband	Zeit nach Anlegen der Infusion (min)					
	-2	5	10	20	30	60
1	114,5	102,8	108,1	92,8	85,5	75,5
2	39,6	38,1	39,2	38,0	39,2	37,5
3	35,3	31,7	34,5	28,8	29,0	27,0
4	44,9	41,7	39,7	38,7	40,7	42,5
5	91,1	89,7	83,1	66,7	67,7	78,7
$\bar{x}$ =	65,1	60,7	60,9	53,0	52,4	52,2
SD =	35,6	32,9	32,9	26,4	23,4	23,4
SEM =	15,9	14,7	14,7	11,8	10,5	10,5

Serumgastrin (pg/ml) nach Gabe von Calcium-
chlorid während Secretin-Infusion

Proband	Zeit nach Gabe von CaCl_2 (min) (Secretin- Infusion)			
	5	10	20	40
1	72,2	72,4	76,7	63,2
2	39,4	37,8	36,5	35,7
3	28,3	28,0	23,0	30,9
4	42,6	41,2	41,6	44,3
5	69,2	79,2	82,5	69,3
$\bar{x}$ =	50,3	51,7	52,1	48,7
SD =	19,4	22,6	26,1	16,8
SEM =	8,6	10,1	11,7	7,5

Serumgastrin (pg/ml) nach der Gabe von Natrium-
chlorid und

Proband Zeit nach Gabe von NaCl (min) während
Secretin-Infusion.

	5	10	20	40
1	74,9	73,2	68,3	67,2
2	38,5	38,1	42,4	41,7
3	26,6	24,8	24,8	20,5
4	37,0	38,2	40,7	40,1
5	76,0	79,6	84,3	86,9
$\bar{x}$ =	50,6	50,8	52,1	51,3
SD =	23,2	24,1	23,8	25,9
SEM =	10,4	10,8	10,6	11,6

Serumgastrin (pg/ml) nach Gabe von Secretin/
Cholecystokinin

Proband Zeit nach Gabe von SC (min)

	5	10	20	40
1	62,8	60,0	59,8	53,1
2	50,5	37,5	32,5	34,6
3	28,8	29,3	16,0	31,5
4	38,7	40,9	31,0	26,7
5	60,4	59,2	49,6	69,1
$\bar{x}$ =	48,2	45,4	37,8	43,0
SD =	14,4	13,6	17,1	17,7
SEM =	6,5	6,1	7,6	7,9

3.3.5.0. Verhalten von Serumgastrin nach intravenöser Gabe von Secretin/Cholecystokinin und nach gleichzeitiger intraduodenaler Gabe von Galle

3.3.5.1. Einführung

Zu einem späteren Zeitpunkt untersuchten wir, ob der durch intraduodenale Gabe von standardisierter Rindergalle (s. Kap. 3.3.1.) hervorgerufene Anstieg des Serumgastrins auch bei gleichzeitiger intravenöser Verabreichung von Secretin/Cholecystokinin zu beobachten ist. Bekanntlich führt Secretin zu einer Suppression der Gastrinausschüttung (26, 66), wie auch eigene Ergebnisse zeigen (s. Kap. 3.3.4.3.).

3.3.5.2. Probanden und Methodik

Bei 7 stoffwechsel- und gastrointestinal gesunden Versuchspersonen wurden nach der von OTTE et al. (51, 52) angegebenen Methode Pankreasfunktionsprüfungen durchgeführt. Dabei wurde neben der Volumen-, Bicarbonat-, Trypsin und Lipaseausscheidung auch der Serumgastrinspiegel in festgelegten Zeitabständen gemessen. Die 7 Probanden erhielten 1 klin. Einheit Secretin* und 1 ID-Einheit Cholecystokinin* pro kg Körpergewicht intravenös injiziert. Nach einer Versuchsdauer von 60 Minuten wurde die gleiche Dosis von Secretin und Cholecystokinin i.v. gegeben und gleichzeitig mittels einer doppelläufigen Dreiling-Sonde 6 g in 20 ml Wasser gelöste Rindergalle in das Duodenum instilliert. Venenblut wurde 2 Minuten vor

* GIH Research Unit, Karolinska-Institut, Stockholm

Secretin/Cholecystokinin, unmittelbar während der Injektion und 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nachher abgenommen. In der zweiten Stunde wurde während Secretin/Cholecystokinin-Injektion und intraduodenaler Galle-Instillation sowie 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nachher Blut entnommen. Das durch Zentrifugieren gewonnene Serum wurde bis zur radioimmunologischen Bestimmung des Gastrinspiegels bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

3.3.5.3. Ergebnis

Der Serumgastrinspiegel fiel nach intravenöser Gabe von Secretin/Cholecystokinin bei allen 7 Probanden von durchschnittlich 54 pg/ml auf 44 pg/ml nach 5 Minuten ab. Nach intraduodenaler Gabe von Galle stieg trotz gleichzeitiger Verabreichung von Secretin/Cholecystokinin der Serumgastrinspiegel bei 6 Probanden an. Der mittlere Anstieg von 41 pg/ml auf 48 pg/ml erfolgte innerhalb von 5 Minuten nach Galle-Gabe (Abb. 24 und Tab. 15).

Erwartungsgemäß wurde durch die gleichzeitige Gabe von Secretin/Cholecystokinin und Galle die stimulierende Wirkung von Secretin/Cholecystokinin auf die Pankreasfunktion verstärkt. Beide Einzelreize summierten sich und führten zu einem deutlicheren Anstieg der Volumen-, Bicarbonat-, Trypsin- und Lipaseausschüttung in der zweiten Stunde des Versuches (Abb. 24, Einzelheiten bei 40).

Tab. 15: Serumgastrin (pg/ml) von Normalpersonen (n = 7) vor und nach i.v.-Gabe von Secretin/Cholecystokin (SC) sowie i.v.-Gabe von Secretin/Cholecystokin und gleichzeitiger intraduodenaler Gabe von Galle (SCTG).

Proband	Zeit nach Gabe von SC (min)						
	-2	2	5	10	20	30	60 ⁺⁺
H. E.	61,2	54,9	52,0	40,2	-	31,6	40,3
F. J.	27,3	24,6	15,0	15,6	-	14,2	14,7
K. J.	51,7	43,0	39,3	30,5	-	24,6	32,3
S. H.	64,5	-	60,1	57,7	-	56,4	62,8
S. W.	37,8	-	34,3	26,0	17,2	14,6	23,9
S. W	97,7	-	70,2	66,7	53,2	67,7	29,1
T. S.	39,7	-	39,5	46,3	39,5	40,5	40,4
n =	7	3	7	7	3	7	7
$\bar{x}$ =	54,3	40,8	44,3	40,4	36,6	35,7	40,5
SD =	13,3	15,3	18,2	18,0	18,2	20,5	19,8
SEM =	8,8	8,8	6,9	6,8	10,5	7,8	7,5

Tab. 15 (Fortsetzung):

[illegible]

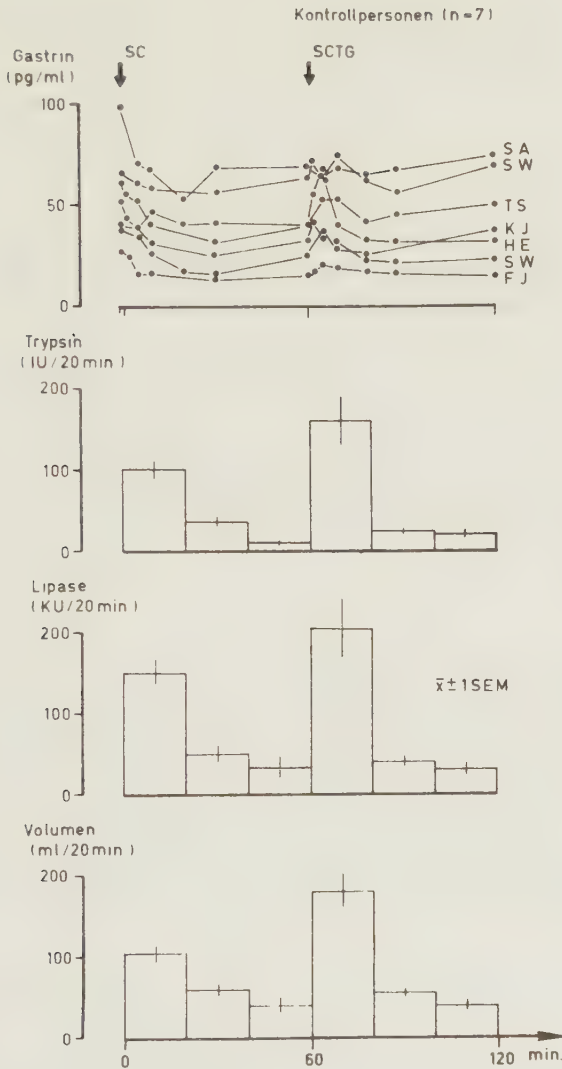


Abb. 24: Verhalten von Serumgastrin (pg/ml), Trypsin-, Lipase- und Volumensekretion von Kontrollpersonen (n = 7) vor und nach intravenöser Gabe von Secretin/Cholecystokinin (SC) sowie intravenöser Gabe von Secretin/Cholecystokinin und gleichzeitiger intraduodenaler Gabe von Galle (SCTG).

3.4.0.0. Verhalten von Serumgastrin bei Insulin-Hypoglykämie 1 Jahr nach selektiv-proximaler Vagotomie

3.4.1.0. Einführung

Als Kontrolle für den Erfolg und die Vollständigkeit der bei Patienten mit Ulcus duodeni vorgenommenen verschiedenen Formen der Vagotomie wird die Insulin-Hypoglykämie (IHG)(29) angewendet. An der Aussagekraft der IHG zur Vagotomie-Kontrolle sind in letzter Zeit jedoch immer mehr Zweifel aufgekommen; es wurden neue gefahrlosere und bessere Untersuchungsmethoden zur prä-, intra- und post-operativen Kontrolle des Vagotomie-Erfolges gesucht (13, 41). Auf die unter Umständen lebensgefährlichen Komplikationen und die Notwendigkeit einer strengen Indikationsstellung haben FEIFEL und Mitarbeiter (12) eindringlich hingewiesen.

Bei der Insulin-Hypoglykämie kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Serumgastrinspiegels beim Gesunden und beim Patienten mit Ulcus duodeni (62, 63). Über das Verhalten des Serumgastrins von vagotomierten Patienten nach Insulin-Hypoglykämie liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor (42). Wir untersuchten daher bei 27 Patienten, bei denen ein Jahr vorher eine selektiv-proximale Vagotomie ohne Pyloroplastik (SPV) vorgenommen worden war, das Verhalten des Serumgastrins während Insulin-Hypoglykämie.

3.4.2.0. Patienten und Methodik

Bei 27 Patienten mit Ulcus duodeni wurde ein Jahr nach SPV eine standardisierte Insulin-Hypoglykämie vorgenommen.

Dabei wurde ihnen nach einer nächtlichen Fastenperiode von mindestens 12 Stunden morgens unter Röntgenkontrolle eine Magensonde zur kontinuierlichen Magensaftaspiration gelegt. Gleichzeitig wurde eine Cubitalvene punktiert, über die 5 Minuten vor sowie 10, 20, 25, 30, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach intravenöser Injektion von 0,2 IE Alt-Insulin pro kg Körpergewicht Blut zur Serumgastrinbestimmung entnommen wurde. Während der gesamten Versuchsdauer wurde außer Serumgastrin auch das Verhalten von Magensäure-Sekretion und Blutzucker untersucht*. Über letztere werden im Rahmen dieser Arbeit keine Einzelheiten mitgeteilt. Es sei lediglich erwähnt, daß die Effektivität der durchgeführten Insulin-Hypoglykämie bei allen Patienten durch einen Blutzuckerabfall auf Werte zwischen 15 und 60 mg% nachgewiesen wurde und die durch SPV erreichte Reduktion der Magensäuresekretion im Mittel 77 % (bezogen auf MAO-Insulin) betrug (43).

3.4.3.0. Ergebnis

Wie Tab. 16 und Abb. 25 zeigen, lag die basale Serumgastrinkonzentration des untersuchten Kollektivs bei durchschnittlich 91 pg/ml. Dieser Wert ist gegenüber dem Nüchternwert des eigenen Normalkollektivs (s. Kap. 3.1.3.) und dem von präoperativen Ulcus-duodeni-Patienten erhöht (43). 10 Minuten nach Insulin-Injektion wurden niedrigere Werte gemessen. Innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach Insulingabe stiegen in 26 von 27 Fällen die Gastrinkonzentrationen an - im Mittel auf ein Maximum von 161 pg/ml. Dieser Anstieg war nach Berechnung mit dem Wilcoxon-Test signifikant ($p < 0,001$).

* An dieser Stelle danken wir der Kollegin S. Wagner und Herrn Prof. Dr. G. FEIFEL (Chir. Universitätsklinik München) für die Überlassung von Serumproben zur Gastrinbestimmung.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigten die Serumgastrinwerte abfallende Tendenz; sie lagen 120 Minuten nach Insulin-Injektion mit durchschnittlich 120 pg/ml jedoch noch über dem Ausgangswert von 91 pg/ml.

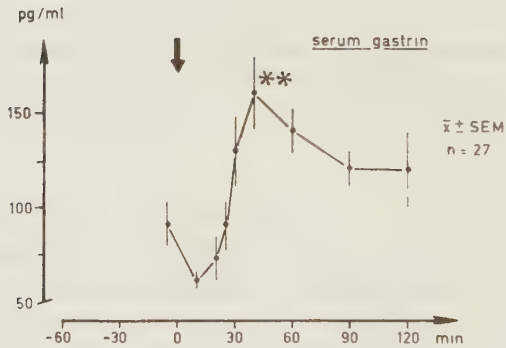


Abb. 25: Verhalten von Serumgastrin selektiv-proximal vagotomierter Patienten ($n = 27$) während standardisierter Insulin-Hypoglykämie ($\downarrow$ = Insulingabe). Signifikanter Gastrinanstieg innerhalb von 40 Minuten (** = $p \leq 0,001$).

Tab. 16: Serumgastrin bei selektiv-proximal vagotomierten Patienten (n = 27) während standardisierter Insulin-Hypoglykämie (0,2 IE Alt-Insulin/kg Körpergewicht)

Patient	...Zeit nach Insulin-Gabe (min)								
Nr.:	-5	10	20	25	30	40	60	90	120
467	50,0	43,0	37,8	39,0	53,0	73,6	72,2	74,2	69,7
338	67,3	-	64,5	65,6	82,0	146,2	133,9	117,6	107,0
320	51,2	49,2	45,3	50,5	71,9	94,9	76,4	62,6	52,3
426	93,1	-	64,4	69,8	99,7	103,8	-	-	60,4
509	50,4	-	40,4	40,8	42,9	95,2	-	-	48,4
584	65,6	-	51,5	47,2	46,4	47,3	-	-	49,0
550	173,7	99,1	88,1	109,5	157,1	191,7	235,3	205,1	160,2
337	160,4	-	125,2	190,9	311,8	251,7	-	-	230,3
435	47,7	45,1	39,8	68,7	207,1	296,0	243,4	185,4	198,8
332	58,8	50,0	46,7	39,5	56,5	97,7	73,9	45,9	38,9
461	54,5	52,9	50,6	53,9	86,6	117,6	108,0	92,5	78,3
282	95,3	70,2	58,6	60,0	90,5	156,6	128,8	140,8	132,2
260	110,1	102,6	102,6	147,5	221,0	269,7	229,9	132,2	123,0
505	56,5	-	43,7	48,2	59,0	77,4	-	-	69,2
340	70,8	55,3	53,5	85,8	167,8	238,0	226,5	181,3	138,3
494	46,5	38,6	34,5	40,3	54,3	59,1	59,4	35,9	44,9
322	131,8	-	113,4	278,9	293,1	327,4	158,0	144,6	137,6
362	76,4	63,7	55,9	68,4	102,2	150,7	133,8	132,9	101,1
357	102,9	-	85,1	82,0	144,1	152,2	-	-	66,5
768	57,3	50,2	44,7	48,7	76,3	101,0	83,9	120,8	90,1
264	63,1	58,6	56,8	78,0	123,0	129,4	99,9	77,8	63,7
390	62,2	49,9	52,2	74,0	101,5	130,3	178,0	224,3	189,9
417	106,4	87,8	89,7	90,4	92,1	116,6	150,1	113,7	97,4
443	383,6	-	332,8	311,6	442,8	504,4	-	-	571,3
669	84,3	68,9	67,8	62,9	80,6	154,3	154,3	118,5	-
398	92,3	77,0	75,3	156,0	197,7	203,6	206,3	160,0	144,5
255	52,7	43,2	38,9	39,4	55,8	71,5	60,1	52,6	49,5
$\bar{x}$ =	91,3	61,4	72,6	90,6	130,3	161,4	140,6	120,9	119,5
SD =	67,4	19,3	57,3	70,1	95,9	100,8	62,3	53,4	105,9
SEM =	13,0	3,7	11,0	13,5	18,5	19,4	12,0	10,3	20,4

3.5.0.0. Verhalten von Serumgastrin nach oraler Gabe von L-Dopa

3.5.1.0. Einführung

STADIL und REHFELD (64) konnten beim Menschen nachweisen, daß Magensäure und Serumgastrin durch niedrige parenteral gegebene Adrenalin Dosen signifikant stimuliert und diese Effekte durch vorherige Gabe des Betarezeptorenblockers Pindolol unterdrückt werden können. Außerdem wurden im Magen-Darm-Trakt endokrin aktive Zellen, sog. APUD-Zellen (54), morphologisch und funktionell charakterisiert (25), die zur Aufnahme und Decarboxylierung von Vorstufen biogener Amine befähigt sind.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde ergibt sich die Fragestellung, ob zum Beispiel Adrenalin vorstufen wie L-Dopa von APUD-Zellen in der Magenschleimhaut zu wirksamen Katecholaminen decarboxyliert werden und über diesen theoretisch möglichen Mechanismus als adäquater Stimulus für eine Gastrinausschüttung dienen können. Wir bestimmten deswegen bei 5 endokrin- und gastrointestinal-gesunden Probanden das Serumgastrin vor und bis zu 120 Minuten nach oraler Gabe von L-Dopa.

3.5.2.0. Probanden und Methodik

Die 6 Probanden bekamen nach 12-stündiger Nahrungskarenz unter Grundumsatzbedingungen 500 mg L-Dopa als Tablette oral verabreicht. Aus einer punktierten und mit einer physiologischen Kochsalz-Lösung offen gehaltenen Cubitalvene erfolgten die Blutentnahmen zur Serumgewinnung 10 Minuten vor, unmittelbar während sowie 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Gabe von L-Dopa. Die Untersuchungen wurden im Rahmen ihrer Dissertation von Frl. de la Fuente-Mit-

scherlich vorgenommen (18), der wir für die Überlassung von Serumproben für die Gastrinbestimmung danken möchten.

3.5.3.0. Ergebnis

Wie in Tab. 17 zusammengestellt, zeigten 5 der 6 Probanden niedrig normale basale Gastrinspiegel. Im Verlauf der Untersuchung war bei keinem Probanden ein signifikanter Anstieg des Gastrins zu beobachten, das ohne zeitliche Korrelation zwischen Werten von durchschnittlich 35 pg/ml und 42 pg/ml schwankte. In der gewählten Testanordnung und Dosis wurde somit keine Stimulierbarkeit des Serumgastrins durch orale L-Dopa-Gabe festgestellt.

Tab. 17: Serumgastrin (pg/ml) vor und nach oraler Gabe von 500 mg L-Dopa bei gesunden Probanden (n = 6)

Proband	Zeit in Minuten					
	-15	0	30	60	90	120
1	33,4	22,7	30,3	37,9	29,9	42,3
2	18,7	13,2	12,5	11,7	15,9	12,7
3	21,4	24,0	17,5	18,7	17,1	18,0
4	21,7	24,3	16,9	19,6	14,9	23,2
5	121,2	123,7	147,1	111,4	111,8	133,6
6	32,3	25,7	26,6	29,5	20,3	23,5
$\bar{x}$ =	41,4	38,9	41,6	38,1	35,0	42,2
SD =	39,5	41,7	52,0	37,0	38,0	45,9
SEM =	16,1	17,1	21,2	15,1	15,5	18,7

3.6.0.0. Einfluß von Somatostatin auf die Glukose-induzierte Gastrinfreisetzung

3.6.1.0. Einführung

Das von BRAZEAU et al. (7) beschriebene Hypothalamus-Hormon Somatostatin, auch Somatotropin-release-inhibiting factor (SRIF) genannt, supprimiert neben dem menschlichen Wachstumshormon (hGH) auch andere Peptidhormone wie TSH, Insulin, Glukagon und Gastrin (1, 45). Sowohl die basale als auch die nahrungsinduzierte Gastrinfreisetzung soll nach BLOOM et al. (6) durch SRIF supprimierbar sein. Da eine Gastrinausschüttung durch Kohlehydrate möglich ist, sollte untersucht werden, ob die Glukose-induzierbare Gastrinfreisetzung durch SRIF verändert wird. Bei 7 endokrinologischen Patienten wurde im Rahmen eines normalen und eines während SRIF-Gabe vorgenommenen oralen Glukosetoleranztestes (OGTT) neben Wachstumshormon (hGH), Insulin, Prolaktin (hPRL) und Glukose auch Gastrin im Serum bestimmt (20).

3.6.2.0. Patienten und Methodik

Vier Patienten (3 Frauen, 1 Mann) mit aktiver Akromegalie, zwei Patienten (1 Frau, 1 Mann) mit Hyperprolaktinämie und Hypophysentumor, und eine Patientin mit Insulinom wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen einem oralen Glukosetoleranztest unterzogen. Nach 15-stündigem Fasten begann der dreieinhalb Stunden dauernde Test um 9 Uhr morgens. 30 Minuten nach Testbeginn bekamen die Patienten 100 g Glukose oral verabreicht. Die Blutentnahmen zur Serumgewinnung erfolgten 30, 15 Minuten und unmittelbar vor der Glukosegabe (Zeitpunkt 0), sowie 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten danach.

Am zweiten Versuchstag bekamen die Patienten zu Beginn des

Versuches 250 μ g cyclisches Somatostatin (Fa. Bachem Chemicals, Marina del Rey, California, USA) als Bolus intravenös injiziert und im Anschluß daran für die Dauer von zweieinhalb Stunden eine Infusion von 500 μ g SRIF in 500 ml physiologischer Kochsalz-Lösung. Die übrige Versuchsanordnung entsprach der des Vortages. Die Serumgastrinspiegel wurden in einem Ansatz in Dreifachwerten nach der in Kap. 2.6. beschriebenen Methode bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test für gepaarte Stichproben.

3.6.3.0. Ergebnis

Drei der vier Patienten mit aktiver Akromegalie (Tab. 18, Abb. 26) zeigten beim oralen Glukosetoleranztest 30 Minuten nach Gabe von 100 g Glukose einen signifikanten Anstieg des Serumgastrinspiegels im Mittel um 47 % ($p < 0,001$). Bei einem Patienten stieg der Gastrinspiegel nach Glukosegabe nur geringfügig, nicht signifikant an. Eine deutliche Suppression des Glukose-induzierten Gastrinanstiegs durch SRIF war bei zwei Patienten festzustellen. Nach Beendigung der SRIF-Infusion kam es zu einer überschießenden Gastrinsekretion in der folgenden halben Stunde ("rebound"). Bei zwei Patienten wurde nur eine geringe Suppression erzielt.

Die basalen Gastrinspiegel waren bei allen Akromegalie-Patienten im Normbereich und verminderten sich bei Gabe von SRIF nur unwesentlich.

Beide Patienten mit Hyperprolaktinämie wiesen normale Nüchterngastrinspiegel auf, die nach oraler Glukosegabe in einem Fall signifikant um 65 % vom Ausgangswert, im anderen Fall nur unbedeutend anstiegen. Bei beiden Patienten wurde die Gastrinsekretion durch SRIF supprimiert - im ersten

Fall deutlich, im zweiten Fall nur gering (Abb. 26 und Tab. 18).

Bei der Patientin mit Insulinom fand sich ein normaler Nüchtergastrinspiegel. Nach oraler Glukosegabe zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Gastrinsekretion. Es war auch keine Suppression durch SRIF zu erkennen (Tab. 18).

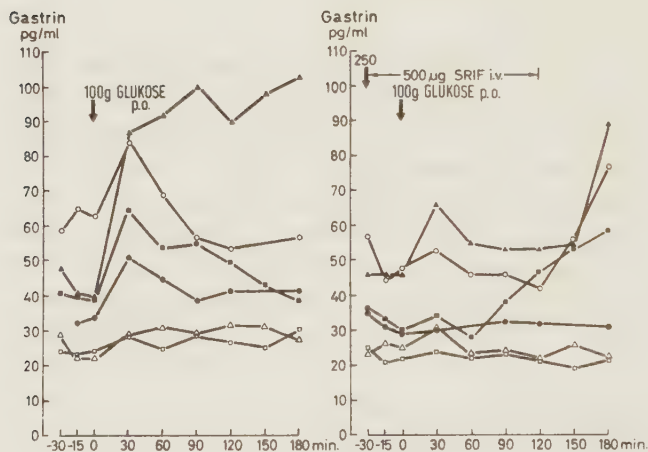


Abb. 26: Verhalten von Serumgastrin (pg/ml) bei Patienten mit aktiver Akromegalie (n = 4) und Hyperprolaktinämie mit Hypophysentumor (n = 2) vor und nach oraler Gabe von 100 g Glukose ohne und bei gleichzeitiger intravenöser Gabe von Somatostatin (SRIF).

Tab. 18: Serumgastrin (pg/ml) während einer normalen (jeweils 1. Zeile) und einer unter Somatostatin (SRIF, jeweils 2. Zeile) vorgenommenen oralen Glukosetoleranz-Testung.

Akromegalie:

Patient Zeit nach Glukose-Gabe (min)

	-30	-15	0	30	60	90	120	150	180
M. N.	59,1	64,8	62,6	84,3	69,2	57,4	54,3	-	56,6
+SRIF	56,6	45,2	48,2	53,0	46,0	45,8	42,0	56,1	76,5
J. G.	48,2	41,1	40,0	86,5	91,9	100,0	90,0	98,5	103,3
+SRIF	46,2	45,9	45,7	65,7	55,3	52,7	52,5	55,0	89,2
H. K.	-	32,3	33,9	50,7	49,7	39,1	42,3	-	41,8
+SRIF	34,6	31,1	29,1	30,1	32,5	-	32,2	-	30,8
G. K.	29,7	22,7	24,2	28,6	25,6	28,0	26,8	25,6	30,8
+SRIF	25,4	21,3	21,7	24,3	22,2	23,1	20,5	19,2	21,4

Hyperprolaktinämie:

Patient Zeit nach Gabe von Glukose (min)

	-30	-15	0	30	60	90	120	150	180
R. W.	40,4	39,6	39,0	64,2	53,6	54,8	49,4	48,0	38,4
+SRIF	36,1	33,2	29,5	34,2	38,3	39,8	46,5	53,4	58,3
A. H.	28,9	22,2	22,5	28,7	30,3	28,2	31,7	21,2	27,2
+SRIF	23,1	26,8	29,8	32,0	23,2	24,1	21,1	25,7	22,4

Insulinom:

Patient Zeit nach Gabe von Glukose (min)

	-30	-15	0	30	60	90	120	150	180
M. G.	-	-	55,9	61,8	59,9	-	-	-	54,4
+SRIF	64,1	54,4	55,9	60,1	58,1	54,1	50,6	60,8	65,0

4.0.0.0. Diskussion

Radioimmunologische Gastrinbestimmung

Die ersten Bestimmungsversuche wurden mit biologischen Testmethoden durchgeführt, welche naturgemäß schlecht reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Für die Erfassung von normalen Gastrinkonzentrationen waren sie außerdem zu unempfindlich (23, 28). Voraussetzung für die bei anderen Peptidhormonen bereits erfolgreich angewandte radioimmunologische Bestimmungsmethode war die Gewinnung von reinem oder synthetischem Gastrin als Antigen. Diese Bedingung wurde durch die Reindarstellung, Strukturaufklärung und Synthese des Gastrinmoleküls erfüllt (22).

Beim Radioimmunoassay (RIA) konkurrieren unmarkiertes und radioaktiv markiertes Antigen um Bindungsstellen von spezifischen Antikörpern gegen dieses Hormon. Das prinzipiell einfache immunologische Verfahren der Antigen-Antikörper-Reaktion, das auch die Grundlage der Gastrinbestimmung darstellt, bringt in der Praxis verschiedene Probleme: 1. die Herstellung von Antiseren gegen Gastrin, 2. die radioaktive Markierung, 3. die Ermittlung der Versuchsbedingungen für die Durchführung der Bestimmung, 4. die Trennung des antikörpergebundenen vom freien Gastrin.

1961 konnten WADELL und Mitarbeiter (69) erstmals ein für Tierversuche brachbares Gastrin-Antiserum aus Schweineantrum-Extrakten herstellen. Mit reinem synthetischen Humangastrin I als Antigen gelang Mc GUIGAN und anderen Autoren (28, 49, 50, 58) die Herstellung von spezifischen Antikörpern. Dabei wird Gastrin zur Steigerung seiner mäßigen Immunogenität an Rinder Serum-Albumin konjugiert (35). Zur Immunisierung werden meistens Kaninchen oder Meerschwein-

chen verwendet, die das konjugierte und in Freund's Adjuvans emulgierte Antigen mehrmals subcutan injiziert bekommen (58). Auf die Produktion von Antikörpern konnte im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden.

Das uns zur Verfügung stehende, von REHFELD und Mitarbeitern (58) bei Kaninchen hergestellte Gastrin-Antiserum 2604 zeichnet sich durch eine hohe Bindungsenergie mit einer Assoziationskonstanten $K^0 = 1,11 \times 10^{12}$ l/mol und durch seine Gastrinspezifität aus (58). Nur mit dem Gastrin strukturell ähnlichen Cholecystokinin besteht eine zu vernachlässigende Kreuzreaktion (1 : 0.006); mit anderen Peptidhormonen konnte keine Kreuzreaktion nachgewiesen werden (58). Die Verwendbarkeit dieses Antiserums für die radioimmunologische Gastrinbestimmung war erwiesen (61)- auch, daß die strukturell geringfügig vom Humangastrin abweichenden Gastrine vom Hund und Schwein (s. Abb. 1) von diesem Antiserum erfaßt wurden (58). Wie eigene Untersuchungen zeigen, verhalten sich Serumgastrin der Ratte und das von uns als Standard verwendete synthetische Humangastrin I (WÜNSCH) zum Antiserum 2604 immuno-identisch (s. Kap. 3.2.1.2.). Damit war es uns möglich, den Normalbereich für Serumgastrin von Wistar - Albinoratten zu ermitteln (s. Kap. 3.2.2.2.). Als weiteres Charakteristikum des Antiserums 2604 ist zu nennen, daß es die Gastrinkomponenten "Component I", "Big Gastrin", "Little Gastrin" und "Mini Gastrin" erfaßt (56, 59).

Die Markierung von Gastrin mit 125 Jod wird nach verschiedenen Modifikationen der von HUNTER und GREENWOOD (32) beschriebenen Chloramin-T-Methode durchgeführt (19, 35, 60). Eine weitere Methode der radioaktiven Markierung wurde von HOLLOWAN beschrieben (28). Dabei wird das 125 Jod-Molekül durch eine enzymatische Reaktion mit Laktoperoxidase an das Gastrinmolekül gebunden.

Wie unter Kap. 2.1.0. im einzelnen beschrieben, wurde eine eigene Modifikation der Chloramin-T-Methode (32) durch Variation der verschiedenen Parameter des Markierungsvorgangs erarbeitet. Dabei konnte schließlich durch kurze Reaktionszeit (10 Sekunden) und einen geringen Anteil von Chloramin T ($10\text{ }\mu\text{g}$) in einem kleinen Reaktionsvolumen von insgesamt $40\text{ }\mu\text{l}$ eine ausreichend hohe spezifische Aktivität von im Mittel $426\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ synthetisches Humangastrin I (ICI) erreicht werden (Kap. 2.1.6.7.), die der von anderen Autoren angegebenen spezifischen Aktivität entsprach (19, 28, 35). Mit der von STADIL und REHFELD (60) beschriebenen "Trace-Jodination" konnte allerdings in mehreren Vorversuchen kein verwendbarer Gastrin-Tracer hergestellt werden (Kap. 2.1.6.5.). Demgegenüber gelang die Markierung vom (15-Leucin) - Human - Gastrin I (WÜNSCH) mit hohen spezifischen Aktivitäten und identischen gel-chromatographischen Verhalten wie beim ^{125}Jod -Gastrin (ICI) (ICI) (s. Kap. 2.1.6.4.); ^{125}Jod -(15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) hatte jedoch seine als Standard im RIA erwiesene vorzügliche Immunreaktivität (s. Kap. 2.3.4.) mit dem Antiserum 2604 verloren (s. Kap. 2.1.6.4.). Dieser reproduzierbare Befund war überraschend, weil das Fehlen eines Methioninrestes in der Aminosäuresequenz von (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) eine weitgehende Oxidationsunempfindlichkeit und eine problemlosere Markierungsreaktion hatte erwarten lassen (70).

Glu • Gly • Pro • Trp • Leu • (Glu)₅ • Ala • Tyr • Gly • Trp • Met • Asp • Phe • NH₂

HUMAN - GASTRIN I (ICI)

Glu • Gly • Pro • Trp • Leu • (Glu)₅ • Ala • Tyr • Gly • Trp • Leu • Asp • Phe • NH₂

[15-Leucin] HUMAN - GASTRIN I (WÜNSCH)

Abb. 27: Strukturformeln von synthetischem Humangastrin I (ICI) und (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH)

Die von YALOW und BERSON (23) vorgeschlagene Rechromatographie eines überalterten Tracers wurde von uns routinemäßig an die sofort nach jeder Markierung vorgenommene gel-chromatographische Trennung von Protein- und Jodid- "peak" über Sephadex G-10 angeschlossen (s. Kap. 2.1.5.). Mit dieser Rechromatographie über Sephadex G 25/50 wurde die Qualität des ¹²⁵Jod-Gastrin verbessert, wie am günstigeren Bindungsverhalten des aus dem abfallenden Schenkel des "peak" für ¹²⁵Jod-Gastrin gewonnenen Tracers erkennbar ist (s. Kap. 2.1.5.). Als Ursache dieser optimierten Immunreaktivität des Tracers muß eine Verringerung des Anteiles von "damaged" und "kaltem", nicht markierten Gastrin angenommen werden. Die Haltbarkeit des ¹²⁵Jod-Gastrins entsprach den Angaben von JAFFE und WALSH (35) und anderen. - Zur Trennung des markierten Hormons vom freien Jod eignen sich auch die Stärkegel-Elektrophorese (11) und die Ionenaustauscher-chromatographie (60).

Das weitere Vorgehen beim RIA erfordert die Verwendung eines Gastrin-Standardpräparates, welches immunologisch identisch mit dem zu untersuchenden Gastrin ist. Dabei ist biologische oder chemische Übereinstimmung nicht in so hohem Maße notwendig. Synthetisches (15-Leucin)-Human-gastrin I (WÜNSCH) erfüllt diese Forderung, wie gezeigt werden konnte (s. Kap. 2.3.4.).

Auf den Ablauf der Reaktion zwischen Gastrin und Gastrin-Antikörper haben verschiedene weitere Bedingungen entscheidenden Einfluß, wie der Proteingehalt des Inkubationsmediums, der pH-Wert, die Temperatur und die Inkubationszeit (10). Alle diese Faktoren wurden ebenso getestet (s. Kap. 2.5.0.) wie die Verwendung des Bakteriostatikum Natriumacid. Erwähnt sei besonders eine Angleichung des pH-Wertes an den im menschlichen Serum gemessenen Wert von pH 7,4. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, daß die Bindungsraten bei pH 7,4 höher waren als bei einem pH-Wert von 8,4 oder 8,6, wie ihn andere Autoren (21, 23, 24, 28) als optimal angeben (s. Kap. 2.5.2.0.). Das Temperaturoptimum für den Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion liegt bei 4°C (s. Kap. 2.5.1.0.). Die Zeitdauer der Inkubation beträgt 48 Stunden, wobei 24 Stunden auf die sog. Vorinkubation entfallen. Bei dieser Vorinkubation wird nur unmarkiertes Gastrin mit dem Gastrin-Antiserum in Kontakt gebracht, und erst mit Zugabe des ¹²⁵Jod-markierten Hormons nach 24 Stunden beginnt die Konkurrenzreaktion zwischen markiertem und unmarkiertem Gastrin. Eine Verlängerung der Vorinkubationsdauer auf 48 und 72 Stunden bringt zwar weitere Zunahme an Genauigkeit und Empfindlichkeit der Messung, ist aber aus Gründen der Zeitersparnis im Routinelaborbetrieb nicht durchführbar (s. Kap. 2.5.4.0.).

Für die Trennung von gebundenem und freien Antigen werden in der Literatur verschiedene Methoden angegeben (11, 28, 35, 55), wie beispielsweise Adsorption an Aktiv-Kohle, Äthanol-Präzipitation, Jonen-Austausch-Harze und "solid-phase"-Techniken. In Anlehnung an die Arbeiten von ERHARDT und Mitarbeitern (10) wurde die Verwendung eines zweiten präzipitierenden Antikörpers, die sog. "double antibody precipitation" (49) gewählt, die für eine Automatisierung des Gastrin-Radioimmunoassay besonders geeignet erscheint (44). Bei dieser Methode wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch weitere Komplexbildung mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, zur Präzipitation gebracht. Diese Präzipitation wird durch Zusatz von Gammaglobulin in ausreichendem Maße ermöglicht, das von der Spezies stammt, die auch den ersten Antikörper gebildet hat (10). Die optimale Konzentration des als "Ko-Präzipitat" eingesetzten Kaninchen-Gamma-Globulins muß auf den zweiten Antikörper in seiner jeweiligen Verdünnung abgestimmt werden (s. Kap. 2.4.4.0.).

Nach den Angaben der Literatur (8, 9, 28, 55) war die Zuverlässigkeit der erstellten Methode zu prüfen. Dies konnte 1. durch den identischen Verlauf von Standardkurve mit (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) und Verdünnungskurven eines hypergastrinämischen Serums (s. Kap. 2.3.4.0.), 2. durch Untersuchungen zur Wiederfindung mit einem errechneten Regressionskoeffizienten zwischen Standard und Wiederfindungskurve von 0,955 für den praktisch wichtigen Meßbereich von 10 bis 250 pg/ml (s. Kap. 2.7.4.0.) und 3. durch den Vergleich des von uns bei 90 gesunden Probanden festgestellten Mittelwertes des Normalbereiches mit Angaben anderer Autoren (s. Tab. 19) nachgewiesen werden.

Tab. 19: Mittelwerte des von verschiedenen Autoren angegebenen Normalbereichs für Serumgastrin (pg/ml)- modifiziert nach STADIL und REHFELD (61)

Autor	Anzahl der Probanden	Mittelwert ($\bar{x} \pm$ S.E.M.)
HANSKY et al. (26)	n = 93	32 $\pm$ 4,3 pg/ml
Mc GUIGAN et al. (49)	n = 35	85 $\pm$ 9,8 pg/ml
GANGULI u. HUNTER (33)	n = 113	105 $\pm$ 7,0 pg/ml
HAUSAMEN et al. (28)	n = 154	45 pg/ml
STADIL u. REHFELD (61)	n = 120	52 $\pm$ 4,6 pg/ml
eigene Untersuchung	n = 90	42 $\pm$ 2,2 pg/ml

Die Präzision der Methode (s.Kap. 2.7.0.) wurde mit Hilfe der sog. Intra-Assay- und Inter-Assay-Variation überprüft (61), die in Form des Variationskoeffizienten (Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert) angegeben wird. Die Intra- und Inter-Assay-Variation wurde jeweils im normalen und hohen Konzentrations-Bereich überprüft. Die erhaltenen Werte der Variationskoeffizienten (s. Kap. 2.7.1. und 2.7.2.) waren in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben über Radioimmunoassays von Gastrin (10, 11, 19, 35, 61) und anderer Polypeptidhormone (21). Die untere Nachweisgrenze - nach MARSCHNER et al. (47) angegeben als das 3-fache der Standardabweichung des Leerwertes B_0 (s. Kap. 2.7.3.) - lag bei 2 pg/ml, so daß auch eine hohe Sensivität für unseren Radioimmunoassay zu beweisen war.

Bei den Beispielen für die experimentelle Anwendung des Gastrin-Radioimmunoassay wurde erstmals nachgewiesen, daß

durch intraduodenale Gabe einer standardisierten Rinder-galle-Präparation eine Hormonfreisetzung aus duodenalen G-Zellen des Menschen möglich ist (s. Kap. 3.3.1.2.) und dieser Effekt von Galle nicht durch intravenöse Bolusinjektionen pharmakologischer Dosen von Secretin/Cholecystokinin supprimiert wird (s. Kap. 3.3.5.3.). Eine Secretin-induzierbare Suppression des Serumgastrin von Normalpersonen und Patienten mit Ulcus duodeni war beschrieben (26, 48, 66). Eine den gemessenen Gastrinanstieg beeinflussende Kreuzreaktion des intravenös injizierten Cholecystokinin war wegen der bekannten Eigenschaften des Antiserum 2604 auszuschließen (58).

Eine Gastrinfreisetzung erfolgt nicht, wenn den Galle-Studien entsprechende Volumina von physiologischer Kochsalzlösung (s. Kap. 3.3.3. und Kap. 3.3.4.) oder eine der Galle äquivalente Lösung von Calcium intraduodenal gegeben wurde (s. Kap. 3.3.2. und Kap. 3.3.4.). Calcium hatte - in höheren Dosen perfundiert (30) - keinen Einfluß auf das Serumgastrin, stimulierte jedoch die exokrine Pankreassekretion des Menschen.

Insgesamt dürfte der von uns beobachtete Galle-induzierte Anstieg von Serumgastrin zu gering sein, um die von uns anfangs postulierte Annahme einer Gastrin-vermittelten Stimulation der pankreatischen Enzymsekretion (s. Kap. 3.3.1.1.) nach intraduodenaler Galle-Applikation zu stützen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Gastrin nach STENING u. GROSSMANN (65) ekbolische Wirkungen am Pankreas hat. Außerdem haben HANSEN et al. (27) inzwischen eine signifikante Freisetzung von Secretin nach intraduodenaler Galle-Instillation gemessen.

Wie von verschiedenen Autoren beschrieben, führen die verschiedenen Vagotomieformen zu einer Zunahme von basalem und

postprandialem Serumgastrin (Lit. bei 43). Auch bei den von uns 1 Jahr nach selektiv-proximaler Vagotomie ohne Pyloroplastik (SPV) untersuchten 27 Patienten lag das Nüchterngastrin mit 91 ± 13 pg/ml (s. Kap. 3.4.3.) im Durchschnitt höher als der mittlere Normalwert mit $42 \pm 2,2$ pg/ml (s. Kap. 3.1.3.). Bei der Interpretation dieses Befundes sind die SPV-induzierte Reduktion der Säuresekretion (43), damit eine verminderte H^+ -Jonen-abhängige Bremsung der antralen Gastrinfreisetzung (24, 48), und ein bei Ratte und Mensch nach Vagotomie deutlich erhöht gefundener Gastringehalt des Antrums zu nennen (3, 31).

An einem rein vagalen Wirkungsmechanismus bei der Insulinhypoglykämie (29) sind nicht zuletzt durch die Untersuchungen von KRONBERG u. Mitarbeitern (38) Zweifel aufgekomen. Diese Autoren hatten in einer Doppelblind-Studie die durch Insulin-Hypoglykämie induzierte Säure- und Gastrinsekretion durch vorherige Gabe β -Rezeptorenblockers Propranolol reduzieren können. Da eine Stimulation von menschlichen Serumgastrin durch physiologische Adrenalin Dosen beschrieben ist und bei der Insulinhypoglykämie endogenes Adrenalin ausgeschüttet wird (64), muß ein adrenerger Mechanismus bei der auch von uns beobachteten Gastrinfreisetzung nach Insulin-Hypoglykämie bei Vagotomierten (s. Kap. 3.4.3.) diskutiert werden.

Die eigenen Untersuchungen mit der Katecholamin-Vorstufe L-Dopa zeigten keine stimulierenden Effekte auf das Serumgastrin (s. Kap. 3.5.3.). Theoretische Voraussetzungen für diese Versuche waren dadurch gegeben, daß L-Dopa und Dopamin die Magenmotilität von Hund und Mensch (67, 68) und die von PEARSE (54) charakterisierten APUD-Zellen im oberen Magen-Darm-Trakt zur Aufnahme und Decarboxylierung von Vorstufen biogener Amine befähigt sein sollen

(25, 46, 54). Eine adrenerge Stimulierung der Gastrin-freisetzung durch lokale Einwirkung von Katecholamin-Vorstufen in APUD-Zellen des Magens war in der von uns gewählten Dosis von L-Dopa nicht gegeben. Diese Aussage muß insofern eingeschränkt werden, als die großen Zeitabstände der Blutentnahmen (jeweils 30 Minuten) die Erfassung von etwaigen kurzdauernden Konzentrationsänderungen des Gastrins nicht zuließen.

Der bekannte supprimierende Einfluß von Somatostatin auf die stimulierte Gastrinsekretion (6, 45) wurde von uns bei Patienten mit nachgewiesener Akromegalie, Hyperprolaktinämie und Insulinom bestätigt. Allerdings war nicht in allen Fällen eine Stimulation der Gastrinfreisetzung durch orale Glukose zu erreichen. Dies entspricht Angaben von REHFELD und STADIL (57), die bei Normalpersonen bereits einen nur mäßigen stimulierenden Effekt von oral verabreichter Glukose beschrieben. Die bei unseren Patienten gemessenen basalen Gastrinwerte waren normal und durch Somatostatin nicht supprimierbar. Die nach Absetzen der SRIF-Infusion auftretende überschießende Sekretion von Gastrin nach vorheriger Suppression ("rebound") korreliert mit der kurzen biologischen Halbwertszeit (45) und dem damit verbundenen raschen Wirkungsverlust des Somatostatins, dessen Bedeutung für die Physiologie und Pathophysiologie der gastrointestinalen Sekretion zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar ist.

5.0.0.0. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Erstellung eines eigenen Radioimmunoassay für Gastrin mit dem von REHFELD zur Verfügung gestellten spezifischen Antiserum 2604 beschrieben. Als Tracer wird ^{125}Jod -markiertes synthetisches Humangastrin I (ICI) mit hoher spezifischer Aktivität verwendet, das mit einer eigenen Modifikation der Chloramin-T-Methode reproduzierbar hergestellt wird. Das synthetische (15-Leucin)-Humangastrin I (WÜNSCH) verlor bei dieser Markierung seine guten immunreaktiven Eigenschaften, die es als Standard bestens geeignet erscheinen ließen. Die Ermittlung optimaler Inkubationsbedingungen und der Einsatz eines präzipitierenden zweiten Antikörpers zur Trennung des Antikörper-gebundenen vom freien Gastrin machte den Aufbau eines präzisen und sensitiven Radioimmunoassay möglich.

Die Normalbereiche für Serumgastrin des Menschen und der Wistar-Albinoratte wurden ermittelt.- Durch intraduodenale Instillation von Galle war das menschliche Serumgastrin signifikant zu stimulieren; der gemessene Anstieg dürfte jedoch für die Galle-induzierte Stimulation der pankreatischen Enzymsekretion keine wesentliche Rolle spielen. Ins Duodenum instilliertes Calcium hatte in der Galle-äquivalenten Menge keinen Einfluß auf das Serumgastrin.- Auch nach selektiv-proximaler Vagotomie (SPV) war das Serumgastrin von Patienten mit Z. n. SPV (1 Jahr postoperativ) durch Insulin-Hypoglykämie signifikant stimulierbar. Hierbei wird ein adrenerger Wirkungsmechanismus diskutiert. Durch orale Applikation der Katecholamin-Vorstufe L-Dopa war bei Normalpersonen jedoch keine Gastrinfreisetzung nachzuweisen. - Somatostatin beeinflusst das normale Basalgastrin

von Patienten mit endokrin aktiven Tumoren nicht,
supprimierte jedoch das durch Glukose nicht in allen
Fällen stimulierte postprandiale Gastrin.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ARNOLD R., W.CREUTZFELD:
Hemmung der pentagastrininduzierten Säuresekretion des Magens beim Menschen durch Somatostatin
Dtsch. med. Wschr. 100, 1014 - 1016 (1975)
- 2 BARRERAS R.F.:
Calcium and gastric secretion
Gastroenterology 64, 1168 - 1184 (1973)
- 3 BECKER H.D., D.D.REEDER, J.C.THOMPSON:
Influence of vagotomy in tissue gastrin levels in stomach and pancreas in rats
Surg. 74, 778 (1973)
- 4 BECKER H.D., D.D.REEDER, J.C.W.EVANS, J.C.THOMPSON:
Gastrin release from duodenum and jejunum in dogs
Surg. Forum 23, 314 - 316 (1972)
- 5 BITTNER R., H.G.BEGER, M.MEVES, J.THOMA, Ch.WIITE, S.WICKERT:
Über die extragastrische Gastrinfreisetzung. Untersuchungen an Patienten nach Gastrektomie und Duodeno-Pankreatektomie
Langenbecks Arch. Forum 4, 273 - 278 (1975)
- 6 BLOOM S.R., C.H.MORTIMER, M.O.THORNER, G.M.BESSER, R.HALL, R.GOMEZ-PAN, V.M.ROY, R.C.G.RUSSELL, D.H.COY, A.J.KASTIN, A.V.SCHALLY:

Inhibition of gastrin and gastric acid
secretion by growth hormone release inhibiting
hormone

Lancet II, 1106 (1974)

- 7 BRAZEAU P., W.VALE, R.BURGUS, N.LING, M.BRUTSCHER,
J.RIVIER, R.GUILLEMIN:
Hypothalamic polypeptide that inhibits the
secretion of immunoreactive pituitary growth
hormone
Science 179, 77 (1973)
- 8 CASE R.M.:
Calcium and gastrointestinal secretion
Digestion 8, 269 - 288 (1973)
- 9 EDKINS J.S.:
On the chemical mechanism of gastric secretion
Proc. roy. Soc. B. 76, 376 (1905)
- 10 ERHARDT F., I.MARSCHNER, R.C.PICKARDT, P.C.SCRIBA:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radio-
immunologischen Thyreotropin-Bestimmung
Z. klin. Chem. klin. Bioch. 11, 381 - 387 (1973)
- 11 EMMENS C.W., S.A.BERSON, R.S.YALOW, E.SAMOLS,
K.J.CATT, B.D.WEINTRAUB, S.W.ROSEN, A.H.TASHJIHAN
jr.:
Measurement of hormones. In: Methods in investiga-
tive and diagnostic endocrinology, Part I, 61 - 154,
Hrsg. S.A.Berson, R.S.Yalow, North-Holland Publ.
Comp. Amsterdam, London, (1973)

- 12 FEIFEL G., H.KEMKES, E.GEIER, A.HEIMANN:
Klinische Untersuchungen zur Problematik und
Gefährdung beim Insulintest
Langenbecks Arch. Forum 3, 107 - 111 (1974)
- 13 FEIFEL G., W.LORENZ, A.HEIMANN, I.WÖRSCING:
Bestimmung der basalen und maximal stimulierten
Magensaftsekretion. Kritische Untersuchungen zur
Durchführung, Auswertung und Beurteilung von
Magensekretionstesten.
Klin. Wschr. 50, 413 - 422 (1972)
- 14 FEURLE G., KETTERER, H.D.BECKER, W.CREUTZFELD:
Circadian serum gastrin concentration in control
persons and in patients with ulcer disease
Scand. J. Gastroent. 7, 177 - 183 (1972)
- 15 FEURLE G.:
Gastrin: Neue Ergebnisse. In: Gastroenterologie
und Stoffwechsel, 230 - 234, Hrsg. V.Becker,
Gerhard Witzstrock GmbH, Baden-Baden, Brüssel
(1974)
- 16 FORELL M.M., M.OTTE, H.J.KOHL, P.LEHNERT, H.P.
STAHLHEBER:
The influence of bile and pure bile salts on
pankreatic secretion in man
Scand. J. Gastroent. 6, 261 - 266 (1971)
- 17 FRITSCH W.P., T.U.HAUSAMEN, Th.SCHOLTEN:
Gastrointestinale Hormone
z. Gastroenterol. 15, 264 - 276 (1977)

- 18 de la FUENTE-MITSCHERLICH G.:
Einfluß von L-Dopa, Alpha- und Betarezeptoren-
blockern und Aminophyllin auf die Sekretion von
Wachstumshormon und Prolaktin beim Menschen
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilian-Uni-
versität, München (1976)
- 19 GANGULI P.C., W.M.HUNTER:
Iodination of gastrin. In: Radioimmunoassay
Methods, Hrsg. K.E.Kirkham, W.M.Hunter, 54 - 60,
Churchill Livingstone, Edinburgh, London (1971)
- 20 GOTTMANN M., R.LANDGRAF, W.LONDONG, K.v.WERDER:
Der Einfluß von Somatostatin auf die orale Gluko-
setoleranz bei aktiver Akromegalie und Hyper-
prolaktinämie
Klin. Wschr. 53, 1161 - 1166 (1975)
- 21 GREENWOOD F.C.:
Peptide Hormones. In: Radioimmunoassay, Hrsg. J.G.
Westerman, 1 - 7, Hospital Medicine Publications
Ltd., London, (1971)
- 22 GREGORY A.A.:
Memorial lecture: The isolation and chemistry of
gastrin
Gastroenterology 51, 953 - 959 (1966)
- 23 GREGORY R.A., M.GROSSMAN, S.EMRIS, B.UVNÄS, R.S.
YALOW, S.A.BERSON, S.ANDERSSON, R.M.ZOLLINGER:
Gastrin. In: Methods in investigative and diagnostic
endocrinology, Part IIID: Gastrointestinal Hormones,
1029 - 1058, Hrsg. R.A.Berson, S.A.Yalow, North-
Holland Publ.Comp., Amsterdam, London (1973)

- 24 GROSSMAN M.:
Gastrin and its activities
Nature 228, 1147 - 1150 (1970)
- 25 GRUBE D.:
Die endokrinen Zellen des Magendarmepithels und
der Stoffwechsel der biogenen Amine im Magendarm-
trakt
G.Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1976)
- 26 HANSKY J., C.SOVENY, M.G.KORMAN:
Effect of secretin on serum gastrin as measured
by radioimmunoassay
Gastroenterology 61, 62 - 68 (1971)
- 27 HANSSSEN L.E., M.OSNES, O.FLATEN, J.MYREN:
Immunoreactive secretin release and pure pancrea-
tic juice after duodenal infusion of bile in man.
Intern. Symp. "Gastrointestinal hormones and pa-
thology of the digestion system", Rom (1977)
- 28 HAUSAMEN T.U., W.P.FRITSCH, J.E.MÜLLER, W.RICK:
Die quantitative Bestimmung der gastrointestinalen
Hormone Gastrin, Sekretin und Cholecystokinin-
Pankreozym. In: Handbuch der inneren Medizin,
5. Aufl., Band III/6 "Pankreas", 401 - 419,
Hrsg. M.M.Forell, S.Springer-Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York (1976)
- 29 HOLLANDER F.:
The insulin test for the presence of intact nerve
fibers after vagal operations for peptic ulcer.
Gastroenterologia 7, 607 (1946)

- 30 HOLTERMÜLLER K.H., J.R.MALAGELADA, J.T.McCALL,
 W.GO:
 Pancreatic, gallbladder, and gastric response
 to intraduodenal calcium perfusion in man.
 Gastroenterology 70, 693 - 697 (1976)
- 31 HUGHES W., A.HERNANDEZ:
 Antral gastrin concentration in patients with
 vagotomy and pyloroplasty
 Gastroenterology 71, 720 - 722 (1976)
- 32 HUNTER W.M., F.C.GREENWOOD:
 Preparation of iodine-131 labelled human growth
 hormone of high specific activity
 Nature 194, 495 - 496, London (1962)
- 33 HUNTER W.M.:
 Radioimmunoassay. In: Handbook of experimental
 Immunology, Vol I, Kap. 17, 1 - 36, Hrsg. D.M.
 Weir, Blackwell Scientific Public., Oxford (1973)
- 34 ISENBERG J.I., J.H.WALSH, M.I.GROSSMAN:
 Zollinger-Ellison-Syndrome
 Gastroenterology 65, 140 - 165 (1973)
- 35 JAFFE B.M., J.H.WALSH:
 Gastrin and related peptides. In: Methods of
 Hormone radioimmunoassay, 251 - 265, Hrsg. B.M.
 Jaffe, H.R.Behrman, Academic Press, New York,
 London (1974)

- 36 KAESS R.:
Fortschritte der Gastrinforschung
Leber, Magen, Darm 2, 115 - 118 (1972)
- 37 KORMAN M.G., C.SOVENY, J.HANSKY:
Extragastric gastrin
Gut 13, 346 - 348 (1972)
- 38 KRONBERG O., T.PEDERSEN, F.STADIL, J.F.REHFELD:
The effect of beta-adrenergic blockade upon
gastric acid and gastrin secretion during
hypoglycaemia before and after vagotomy.
Scand. J. Gastroent. 9, 173 - 176 (1974)
- 39 LONDONG W., S.FRÜHAUF, M.M.FORELL:
Verhalten von Serumgastrin nach intraduodenaler
Gabe von Galle
Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 80, 516 - 518 (1974)
- 40 LONDONG W., S.FRÜHAUF, G.KLEWAR, M.OTTE, M.M.
FORELL:
Weitere Untersuchungen zur Gastrinfreisetzung
nach intraduodenaler Gabe von Galle
Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 82, 991 - 994 (1976)
- 41 LONDONG W., F.BÜSL, G.FEIFEL, V.ZUMTOBEL, P.
KIEFHABER, M.M.FORELL:
Stimulierte Gastrinsekretion als postoperative
Vagotomiekontrolle
II. Kongreß d. Ges. f. Gastroent. i.Bayern (1974)

- 42 LONDONG W., E.GEIER, G.FEIFEL, M.M.FORELL:
Hypoglykämie-induzierte Gastrinfreisetzung nach
Vagotomie
Z. Gastroenterol. 13, 418 - 423 (1975)
- 43 LONDONG W., G.FEIFEL, S.WAGNER, F.BÜSL, V.ZUMTOBEL:
Gastrin response to test meal and hypoglycaemia up
to one year after proximal selective vagotomy
Chir. Gastroent. 11, 85 - 89 (1977)
- 44 LONDONG W., G.KLEWAR, V.LONDONG, M.M.FORELL:
Automatisierbare Methode der radioimmunologischen
Gastrinbestimmung
II. Kongreß d. Ges. f. Gastroent. i.Bayern (1974)
- 45 LUCKE C., H.J.MITZKAT, A.VON ZUR MÜHLEN:
Somatostatin
Klin. Wschr. 54, 293 - 301 (1976)
- 46 MAKHLOUF G.M.:
The neuroendogenic design of the gut
Gastroenterology 67, 159 - 184 (1974)
- 47 MARSCHNER I., F.ERHARDT, P.C.SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard curve
by "spline function". In: Radioimmunoassay and
related procedures in medicine, 111 - 122, Inter-
national Atomic Energy Agency, Wien (1974)
- 48 McGUIGAN J.E.:
Disorders of gastrin secretion
Adv. Intern. Med. 19, 175 - 193 (1974)

- 49 McGUIGAN J.E.:
Immunochemical studies with synthetic human
gastrin
Gastroenterology 54, 1005 - 1011 (1968)
- 50 ODELL W.D., A.C.CHARTERS, W.D.DAVIDSSON, J.C.
THOMPSON:
Radioimmunoassay for human gastrin using unconjugated gastrin as an antigen
J. clin. endocr. Metabol. 28, 1840 - 1842 (1968)
- 51 OTTE M., H.P.STAHLHEBER, P.LEHNERT, M.M.FORELL,
G.R. THURMAYER, R.THURMAYER:
Diagnostischer Wert der Pankreasfunktionsprüfung
mit Cholecystokinin-Pankreocymin, Sekretin und
Galle.
Klin. Wschr. 51, 921 - 925 (1973)
- 52 OTTE M., H.P.STAHLHEBER, M.ZOELCH, M.M.FORELL:
Pankreassekretion des Menschen nach Stimulation
mit Cholecystokinin-Pankreocymin, Sekretin und
Galle.
Klin. Wschr. 51, 915 - 920 (1973)
- 53 PASSARO E.Jr., N.BASSO, J.N.WALSH:
Calcium and serum gastrin
Gastroenterology 64, 503 - 509 (1973)
- 54 PEARSE A.G.E.:
The gut as an endocrine organ. In: Proc. of the
Symp. on Adv. Med. 400 - 409, Hrsg. G.Walker,
Pitman, London (1973)

- 55 RATCLIFFE J.G.:
Separation techniques in saturation analysis
Br. Med. Bull. 32 - 37 (1974)
- 56 REHFELD J.F.:
Three components of gastrin in human serum. Gel
filtration studies on the molecular size of
immunoreactive serum gastrin
Biochem. Biophys. Acta 285, 364 - 372 (1972)
- 57 REHFELD J.F., F.STADIL:
The glucose-induced gastrointestinal stimulation
of insulin in man: Relation to age and to gastrin
release.
Europ. J. Clin. Invest. 5, 273 - 283 (1975)
- 58 REHFELD J.F., F.STADIL, B.RUBIN:
Production and evaluation of antibodies for the
radioimmunoassay of gastrin
Scand. J. clin. Lab. Invest. 30, 221 - 232 (1972)
- 59 REHFELD J.F., F.STADIL, J.VIKELSGÆ:
Immunoreactive gastrin components in human serum
Gut 15, 102 - 111 (1974)
- 60 STADIL F., J.F.REHFELD:
Preparation of 125-I-labelled synthetic human
gastrin for radioimmunoanalysis
Scand. J. clin. Invest. 30, 361 - 386 (1972)

- 61 STADIL F., J.F.REHFELD:
Determination of gastrin in serum. An evaluation
of the reliability of a radioimmunoassay
Scand. J. Gastroent. 8, 101 - 112 (1973)
- 62 STADIL F., J.F.REHFELD:
Effect of insulin injektion on serum gastrin con-
centrations in duodenal ulcer patients and normal
subjects
Scand. J. Gastroent. 3, 143 - 147 (1974)
- 63 STADIL F., J.F.REHFELD:
Hypoglycaemic release of gastrin in man
Scand. J. Gastroent. 7, 509 - 514 (1972)
- 64 STADIL F., J.F.REHFELD:
Release of gastrin by epinephrine in man
Gastroenterology 65, 210 - 215 (1973)
- 65 STENING G.F., M.I.GROSSMAN:
Gastrin-related peptides as stimulants of pancreatic
and gastric secretion.
Amer. J. Physiol. 217, 262 - 266 (1969)
- 66 THOMPSON J.C., D.D.REEDER, H.H.BUNCHMAN, H.D.BECKER,
E.N.BRANDT jr.:
Effect of secretin on circulating gastrin
Ann. Surg. 176, 384 - 392 (1972)
- 67 VALENZUELA J.E.:
Gastric relaxation produced by dopamine
Gastroenterology 70, A-87/945 (1976)

- 68 VALENZUELA J.E., A.L.EGUIGUREN:
Effect of L-Dopa on human intragastric pressure
Gastroenterology 70, A-87/945 (1976)
- 69 WADELL W.R., J.P.LYTHGOE, A.P.MONACO:
Immunological studies of gastrin
Science 134, 2099 - 2100 (1961)
- 70 WÜNSCH E.:
Zur Chemie gastrointestinaler Hormone
Helv. med. Acta 37, 307 - 320 (1974)
- 71 WÜNSCH E., E.JÄGER, M.DEFFNER, R.SCHARF:
Zur Synthese des (15-Leucin)-Humangastrin I
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1716 - 1720
(1972)
- 72 YALOW R.S., S.A.BERSON:
State of hormones in blood. In: Methods in
investigative and diagnostic endocrinology
Part.I, Kap. 5, 155 - 168, Hrsg. S.A.Berson,
R.S.Yalow, North-Holland Publ. Comp.,
Amsterdam, London (1973)

Für die freundliche Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. med. M.M. Forell.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. W. Londong für seine unermüdliche und großzügige Hilfe, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Medizinischen und Chirurgischen Klinik, die mir bereitwillig Untersuchungsmaterial zur Verfügung stellten.

Frl. F. Haag danke ich für die Anfertigung der photographischen Abbildungen.

LEBENS LAUF

Am 22.9.1950 wurde ich als einziges Kind von Dr. med. Fritz Klewar, prakt. Arzt in Diessen, und seiner Ehefrau Brunhilde, geb. Weiser, in Rieden, Kreis Landsberg a. Lech, geboren.

Von 1956 bis 1961 besuchte ich die Volksschule Diessen, von 1961 bis 1970 das Humanistische Gymnasium Weilheim. 1970 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1971 nahm ich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München das Studium der Humanmedizin auf.

Im April 1972 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, Im April 1973 die Ärztliche Vorprüfung und im September 1976 die Ärztliche Prüfung ab.

Von Oktober 1976 bis Dezember 1977 war ich als Medizinalassistent im Städt. Krankenhaus Kaufbeuren und in der Städt. Kinderklinik Regensburg tätig.

Seit 12. April 1976 bin ich mit Ursula Klewar, geb. Kohlmann, verheiratet.

Seit Januar 1978 leiste ich als Truppenarzt meinen Grundwehrdienst ab.

